

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



MICHAELA VAŠKOVÁ

**Protilátky proti lektinu PA-III jako prostředek prevence bakteriálních
infekcí u pacientů s cystickou fibrosou**

**Antibody against lectin PA-III as a tool preventing bacterial infections
of cystic fibrosis patients**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2017

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení této bakalářské práce, cenné rady a připomínky při jejím zpracování.

Dále bych chtěla poděkovat kolektivu katedry biochemie, zejména RNDr. Lucii Vaškové a Bc. Janu Královi, za spolupráci a pomoc během experimentální činnosti.

Děkuji své rodině za poskytnuté zázemí a podporu.

Abstrakt

Cystická fibrosa je autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutací genu *CFTR*, která vede k poškození stejnojmenného proteinu s funkcí iontového kanálu. V důsledku poškození dochází k narušení rovnováhy elektrolytů. Nejvíce je postiženo dýchací ústrojí, kde dochází k zahuštění hlenu a ke změnám v glykosylaci povrchových struktur buněk plicního epitelu. Výše uvedené změny vedou k nedostatečné obranné funkci plic a větší náchylnosti k bakteriálním infekcím. Nejčastějším patogenem dýchacích cest pacientů s CF je *Pseudomonas aeruginosa*. Tato bakterie obsahuje řadu virulentních faktorů a má schopnost tvořit biofilm, který ji chrání před obrannými mechanismy hostitele a účinky antibiotik. Léčba antibiotiky je navíc komplikovaná vznikem rezistencí.

Slepičí protilátky vykazují značný potenciál jako prostředek prevence bakteriálních infekcí plic u pacientů s CF. Efekt specifických a nespecifických protilátek na adhezenci kontrolního kmenu *Pseudomonas aeruginosa* (PAK, ST 1763) *ex vivo* byl sledován na modelovém systému buněčných linií plicních epitelálních buněk od pacienta s CF (CuFi-1) a zdravého jedince (NuLi-1). Bakteriální a plicní buňky byly značeny fluorescenčními barvivami PKH, vyhodnocení bylo prováděno spektrofotometricky.

Bylo ověřeno, že slepičí protilátky proti PA-IIL mají schopnost specificky rozeznat daný antigen a v převážné většině případů jsou schopné snižovat bakteriální adhezi. Tento trend však nekoreluje s reaktivitou ověřenou metodou ELISA. Kontrolní (preimunní) protilátky naopak adhezi výrazně zvyšují, což je pravděpodobně způsobeno aglutinací PA spojenou s tvorbou plaků. Rozdíly v chování preimunní a specifické protilátky jsou připisovány nejen anti-PA-IIL protilátkám, ale také protilátkám proti imunizačnímu adjuvans, které jsou společně přítomny ve vaječném žloutku. Bylo zjištěno, že protilátky proti adjuvans (tedy obsaženým mykobakteriím) významně ovlivňují adhezenci PA na buňky plicního epitelu. Delší časová prodleva (2 dny) mezi barvením epitelálních buněk a expozicí bakteriím při adhezním testu zvyrazňuje protektivní schopnost specifických protilátek vůči adhezenci bakterií.

Klíčová slova: plicní buňky, *Pseudomonas aeruginosa*, fluorescence, žloutkové imunoglobuliny

Abstract

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disease caused by mutation of the *CFTR* gene. This mutation results in the damage of protein with ion channel function. As a consequence of this damage, electrolyte equilibrium is impaired. The respiratory tract is affected the most because of the mucus thickening and changes in the glycosylation of lung epithelium cell surface structures. These changes lead to an insufficient defense function of lungs and greater susceptibility to bacterial infections. The most common pathogen of respiratory tract of CF patients is *Pseudomonas aeruginosa*. This bacterium contains numerous virulence factors and has the ability to form a biofilm that protects it against the host defense mechanisms and antibiotic effect. Antibiotic treatment is also complicated by the development of bacterium resistance.

Chicken antibodies have a considerable potential as a tool for preventing bacterial lung infections of CF patients. The influence of specific and nonspecific antibodies on the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* (PAK, ST 1763) *ex vivo* was monitored on a model system of lung epithelia cells from a CF patient (CuFi-1) and a healthy individual (NuLi-1). Bacterial and pulmonary cells were labeled with PKH fluorescent dyes to allow their spectrofluorimetric determination.

It has been verified that anti-PA-IIL chicken antibodies have the ability to specifically recognize the antigen and, in vast majority of cases, reduce bacterial adhesion. Unexpectedly, this effect does not correlate with the antibody reactivity verified on ELISA. Control (pre-immune) immunoglobulines, on the contrary, significantly increase the adhesion which is probably due to the PA agglutination associated with plaque creation. The differences in behavior of pre-immune and specific antibodies are probably attributed not only to anti-PA-IIL antibodies but also to anti-immunisation adjuvans that are expected to be present in the egg yolk. Adjuvant antibodies (likely against mycobacteria) have been found to significantly affect the adhesion of PA to lung epithelial cells. Longer interval (up 2 days) between epithelial cell staining and bacterial exposure in the adhesion assay elevates the protective ability of specific antibodies against bacterial adherence.

Key words: lung cells, *Pseudomonas aeruginosa*, fluorescence, yolk immunoglobulins

Obsah

Seznam zkratek	1
1 Úvod.....	2
1.1 Cystická fibrosa.....	2
1.2 Gen pro CFTR protein	2
1.3 Dědičnost.....	3
1.4 Projevy onemocnění.....	4
1.5 Patogeneze plic.....	5
1.6 Léčba	5
1.7 Diagnostika onemocnění	6
1.8 Imunitní systém nemocných	7
1.8.1 Nespecifická imunita	7
1.8.2 Specifická imunita	7
1.9 Protilátky	8
1.9.1 Slepíčí protilátky	9
1.9.2 Produkce protilátek	10
1.10 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.10.1 Virulentní faktory PA	12
1.10.2 Rezistence na antibiotika	13
1.10.3 Bakteriální lektiny.....	14
2 Cíl práce	16
3 Materiál a metody	17
3.1 Použité chemikálie a přístroje	17
3.1.1 Přístroje	17
3.1.2 Materiál.....	18
3.2 Práce s tkáňovými kulturami.....	19

3.2.1	Rozmrazení CuFi-1 a NuLi-1	19
3.2.2	Kultivace linií	20
3.2.3	Příprava kultivačních lahví potažených kolagenem	20
3.2.4	Subkultivace buněčných linií	20
3.2.5	Určení počtu a viability buněk pomocí trypanové modři	21
3.3	Práce s <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
3.3.1	Rozmrazení a kultivace PAK	22
3.3.2	Zamrazení PAK	22
3.3.3	Určení množství bakteriálních buněk v suspenzi	22
3.4	Fluorescenční značení	22
3.4.1	Fluorescenční značení plicních epiteliálních buněk pomocí PKH67	23
3.4.2	Fluorescenční značení bakterií pomocí PKH26	23
3.5	Adhezní test	24
3.6	ELISA	26
4	Výsledky	28
4.1	ELISA	28
4.1.1	Reaktivita protilátek vůči PA-IIL	28
4.2	Adhezní testy	30
4.2.1	Ověření vlivu anti-PA-IIL protilátky na adhezi PAK	30
4.2.2	Vliv časové prodlevy po barvení buněk na adhezi bakterií	32
4.2.3	Vliv indiferentních protilátek na adhezi PA	33
4.2.4	Mikroskopické pozorování	36
5	Diskuze	38
6	Souhrn	42
7	Seznam použité literatury	43

Seznam zkratek

ABC	„ATP-binding cassette“
ASL	„airway surface liquid“, povrchová plicní kapalina
bp	„base pair“, pár bází
BSA	hovězí sérový albumin
CF	cystická fibrosa
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS	fetální telecí sérum
Ig	imunoglobulin
IRT	imunoreaktivní trypsin
kb	kilobáze
kDa	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti
KLH	„keyhole limpet hemocyanin“
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IL, PA-IIL	lektiny <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IIL DAM	lektin modifikovaný diazomethanem
PA-IIL Δ G/fuc	lektin s mutací snižující afinitu pro fukosu
PBS	“phosphate buffered saline”
PCL	„periciliary liquid“, meziřasinková kapalina
RPM	počet otáček za minutu

1 Úvod

1.1 Cystická fibrosa

Cystická fibrosa (CF) patří mezi nejčastější autozomálně recesivní onemocnění evropské populace. Obecně postihuje jednoho z 2500 – 4500 novorozenců a v populaci je nositelem mutovaného genu způsobujícího CF přibližně každý 26. jedinec¹.

Toto onemocnění je způsobeno mutací tzv. *CFTR* genu (z angl. „cystic fibrosis transmembrane-conductance regulator“), která vede k produkci stejnojmenného proteinu s pozměněnou strukturou a funkcí. Nejvíce se nemoc projevuje komplikacemi spojenými s dýchacím, trávicím a reprodukčním ústrojím.

Zlepšením zdravotní péče a rozvojem nových léčebných metod se v posledních letech značně zvýšila kvalita a doba života pacientů s CF. V současnosti se polovina nemocných dožije věku vyššího než 37 let².

1.2 Gen pro CFTR protein

CFTR gen se nachází na chromozomu 7q31.2, jeho velikost je přes 250 bp (z angl. „base pair“, pár bází) a obsahuje 27 kódujících exonů.

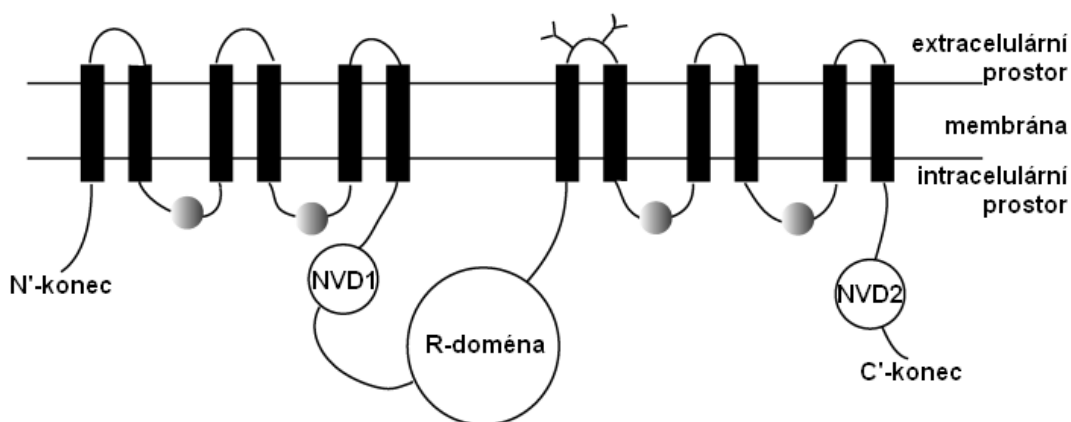
Nejčastěji se vyskytující mutací u nemocných s CF je mutace označená $\Delta F508$. Ta je způsobena delecí 3 bp kódujících fenylalanin v *CFTR* proteinu v pozici 508³.

Bylo zjištěno více než tisíc různých mutací v rámci celého *CFTR* genu. Často se mutace projevují v tzv. nukleotid-vázajících doménách a v regulační doméně. Tyto domény se jeví jako důležité z hlediska funkce a struktury proteinu. Podle mechanismu narušení funkce a syntézy proteinu *CFTR* lze mutace rozdělit do 5 skupin:

1. třída I: mutace ovlivňující biosyntézu
2. třída II: mutace ovlivňující maturaci proteinu (mutace $\Delta F508$)
3. třída III: mutace ovlivňující transportní funkci a regulaci chloridového kanálu
4. třída IV: mutace ovlivňující vodivost kanálu
5. třída V: mutace ovlivňující stabilitu proteinu⁴.

CFTR protein je membránový transportér, který se řadí do tzv. ABC rodiny (z angl. „ATP-binding cassette“, ATP-vázající), kde je jedinečným členem majícím funkci iontového kanálu. Tento protein obsahuje 1480 aminokyselin a jeho struktura sestává ze dvou hlavních částí spojených regulační doménou na intracelulární straně.

Každá ze dvou částí obsahuje nukleotid-vázající doménu a šest transmembránových segmentů⁵ (obrázek 1).



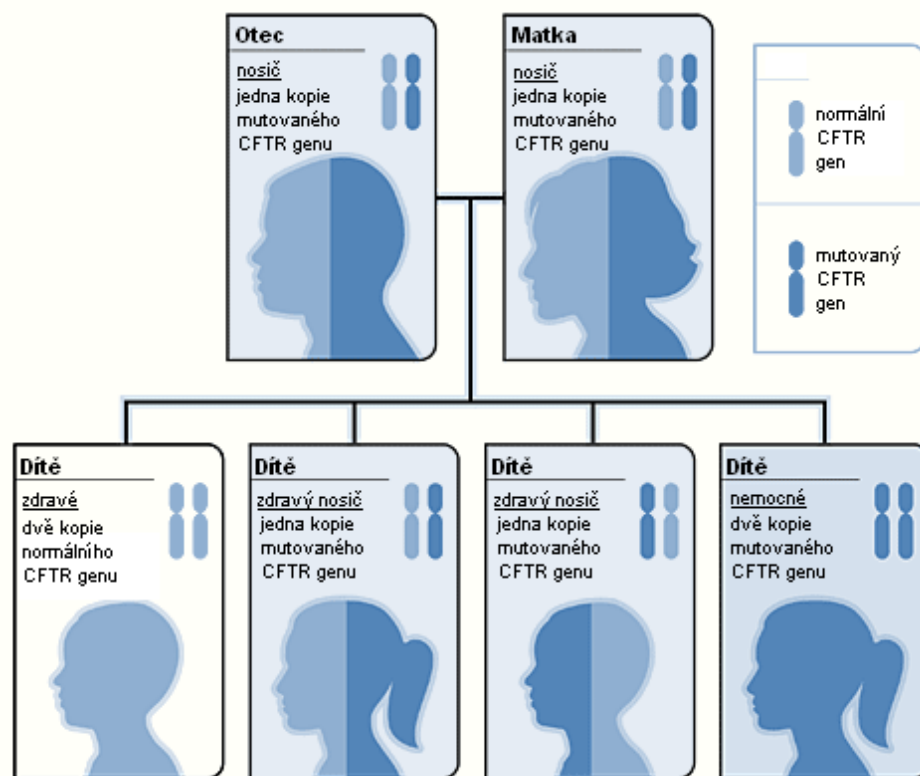
Obrázek 1 – Struktura CFTR proteinu. Protein se skládá ze dvou částí spojených regulační doménou (R-doména). Každá polovina obsahuje nukleotid-vázající doménu (NVD1, NVD2) a 6 segmentů procházejících membránou. Obrázek byl převzat a upraven⁴.

CFTR protein se nachází na apikální membráně epitelálních buněk, kde hraje významnou roli v transportu elektrolytů a transepiteliální tekutiny. U střevních, pankreatických a plicních buněk zajišťuje sekreci Cl^- a HCO_3^- iontů a v buňkách potních žláz řídí zpětnou absorpci solí. Nesprávná funkce tohoto proteinu vede k řadě poruch v těle nemocného člověka⁶.

1.3 Dědičnost

CF je autozomálně recesivní onemocnění, vzniká tedy, pouze pokud oba přítomné rodičovské *CFTR* geny obsahují mutaci. Zdravým nosičem je potom každý jedinec mající pouze jeden mutovaný gen *CFTR*.

Pokud jsou oba rodiče nosiči mutace, potom je pravděpodobnost narození dítěte trpícího CF 25 % (získá oba mutované geny), dále je 50% pravděpodobnost narození dítěte jako zdravého nosiče CF (získá pouze jeden mutovaný gen), a nakonec 25% šance, že bude dítě zdravé (nezíská ani jeden mutovaný gen)² (obrázek 2 na straně 4).



Obrázek 2 – Autozomálně recesivní dědičnost CF. Ilustrační příklad pro situaci, kdy jsou oba rodiče nosiči mutovaného *CFTR* genu. V tomto případě je 25% pravděpodobnost narození zdravého, stejně tak jako nemocného dítěte, a 50% pravděpodobnost narození zdravého nosiče mutovaného *CFTR* genu. Převzato a upraveno⁷.

1.4 Projevy onemocnění

K typickým projevům onemocnění patří chronické infekce dýchacích cest, poškození správné funkce zažívacího ústrojí a slinivky, narušení funkce pohlavních orgánů a vysoký obsah solí v potu.

Kvůli nedostatečné produkci pankreatických enzymů dochází k porušenému vstřebávání živin a některých vitamínů. Tato porucha se často objeví již v prvních letech života. Funkce trávicího traktu je také ovlivněna produkcí hustého hlenu⁸. U novorozenců je tento hustý hlen ve střevech spojen se vznikem tzv. mekoniového ilea.

Produkce hustého hlenu může být také spojena se sníženou plodností žen trpících CF. V mužské populaci se udává více než 95% neplodnost způsobená změnami chámovodu.

Projevy spojené s dýchacím ústrojím patří k nejčastějším příčinám nemoci a úmrtí pacientů s CF. Častým projevem je kašel, změny v produkci sputa a dušnost. Selhání plic bývá způsobeno zejména bakteriálními infekcemi⁹.

1.5 Patogeneze plic

Mezi hlavní příčiny patologických stavů patří porucha přirozeného obranného mechanismu proti bakteriálním infekcím. Povrch plicního epitelu pokrývá tzv. ASL (z angl. „airway surface liquid“, povrchová plicní kapalina). Její součástí je tzv. PCL (z angl. „periciliary liquid“, meziřasinková kapalina). Síla vrstvy této kapaliny ovlivňuje pohyb řasinek epitelu. Nad ní se dále nachází vrstva hlenu, která obsahuje muciny odpovědné za vazkost. Vlastnosti obou složek jsou ovlivněny transportem iontů. V plicích nemocných pacientů dochází k nadměrné absorpci Na^+ a snížené sekreci Cl^- iontů, což vede ke snižování množství solí a vody v hlenu a vyčerpání PCL. Hlen obsahující cizorodé částice se tedy nemůže pohybovat normálním způsobem ven z plic, čímž je porušena jejich přirozená samočisticí schopnost. Mechanická ochrana je doplněna ještě antimikrobiální aktivitou, na níž se podílí např. lysozym a lactoferrin^{10,11}.

Přilnutí hlenu k povrchu po vyčerpání PCL a stálá produkce mucinů vede ke vzniku zahuštěných plaků, v nichž dochází k vyčerpání kyslíku a vytvoření ideálního prostředí pro množení bakterií. Bakterie zde začnou tvořit kolonie a dochází k chronické infekci¹².

Další změnou v plicním epitelu pacientů s CF je snížená míra sialyzace glykokonjugátů, které se vyskytují na plazmatické membráně buněk, a zvýšená míra sulfatace a fukosylace glykoproteinů obsažených v hlenu. Příčinou tohoto jevu může být pozmeněné pH v Golgiho aparátu, kde dochází k biosyntéze těchto molekul. V buňkách nemocného je pH kyslejší, což ovlivňuje kinetiku některých enzymů, které se syntézy účastní. Pozmeněné glykokonjugáty pravděpodobně podporují vazbu patogenů a napomáhají bakteriím v adhezi na plicní epitel^{13,14}.

1.6 Léčba

CF patří k onemocněním, u kterých se využívají terapie zmírňující pouze projevy, nikoliv příčinu onemocnění. Samotnou příčinu onemocnění, tedy mutaci *CFTR* genu, by v budoucnu mohla vyřešit genová terapie, která je stále předmětem výzkumu.

Cílem léčebných postupů je prodloužení a zvýšení kvality života nemocného. Pro udržení dobrého prospívání pacienta je důležitá správná výživa podpořená ve většině případů ještě doplňky stravy obsahujícími chybějící trávicí enzymy.

Největší důraz je kladen na zmírnění projevů týkajících se dýchacího ústrojí. Zde je nejdůležitější podpora samočisticího schopnosti plic a boj s bakteriálními infekcemi.

Dechová cvičení a inhalace hypertonických solných roztoků jsou důležitým nástrojem pro podporu odstraňování hlenu a správnou funkci plic.

Nejzávažnějšími komplikacemi jsou bakteriální infekce. Jejich léčba spočívá v podávání antibiotik, a to často dlouhodobě a ve vysokých dávkách. Pro výběr vhodného druhu antibiotik je nezbytné vyšetření sputa. Důležité je okamžité zahájení léčby. Při vzniku chronické infekce se uplatňuje preventivní intravenózní antibiotická léčba. Dlouhotrvající záněty bývají léčeny glukokortikoidy, jejich dlouhodobé užívání však není vhodné z důvodu řady vedlejších účinků.

Transplantace plic se zvažuje v pokročilém stádiu nemoci, kdy nedochází ke zlepšení zdravotního stavu a nemocný nereaguje na prováděnou léčbu^{2,11}.

Dalším terapeutickým přístupem je imunizace. Ta je cílena na virulentní faktory daného patogenu, zde *Pseudomonas aeruginosa*, z nichž jsou nejvíce sledovány následující: bičík, pili, lipopolysacharidy, alginát a vnější membránové proteiny. Jako účinná se jeví imunizace vnějšími membránovými proteiny v přítomnosti flagelinu. Slibné se zdají být konjugativní vakcíny. Inovativním přístupem s velkým potenciálem je také DNA vakcinace a genetická imunizace^{15,16}.

1.7 Diagnostika onemocnění

Diagnostika onemocnění je založena na klinických příznacích nebo novorozeneckém „screeningu“, následně je diagnóza potvrzena potním testem a molekulárně genetickým vyšetřením *CFTR* genu.

Při novorozeneckém „screeningu“ se měří množství imunoreaktivního trypsinogenu v krvi novorozence (IRT). Při jeho zvýšeném množství následuje molekulárně genetické vyšetření^{17,18}.

Potní test slouží ke stanovení koncentrace chloridových a sodných iontů v potu. Je prováděn metodou podle Gibsona a Cooka, která využívá pilokarpinovou iontoforézu. Tato metoda je bezbolestná a rychlá¹⁹. Koncentrace chloridových iontů vyšší než 60 mmol/l se vyskytuje přibližně u 98 % nemocných²⁰.

Molekulárně genetické vyšetření pomáhá k určení přesné diagnózy CF. Podstoupení tohoto vyšetření se doporučuje u jedinců, v jejichž příbuzenstvu se CF již vyskytla.

Vyšetření plodu se provádí v rámci prenatální diagnostiky, při které se odebírají buňky z placenty nebo vzorek plodové vody. Tuto diagnostiku mají možnost podstoupit rodiny,

u nichž je 25% riziko výskytu CF. Při pozitivním výsledku mají rodiče možnost rozhodnout se pro ukončení těhotenství do konce 24. týdne.

1.8 Imunitní systém nemocných

Imunitní systém novorozenců nevykazuje odchylky od zdravých jedinců. Postupným rozvinutím onemocnění s přibývajícím věkem však dochází k řadě sekundárních změn souvisejících přirozenou obranou organismu, zejména dochází k nárůstu hladiny imunoglobulinů.

Imunitní systém nemocných není postižen a vykazuje přiměřenou reakci na přítomnost infekce. Změna prostředí vyvolaná onemocněním však brání účinnému odstranění cizorodých látek z organismu, což způsobuje komplikace zejména v plicích².

1.8.1 Nespecifická imunita

Vrozená imunita je nespecifický mechanismus reagující na celou řadu různých patogenů díky rozpoznávání jejich společných strukturních či funkčních motivů. Patří sem buněčné systémy jako např. fagocyty buňky a NK buňky (z angl. „natural killers“), a dále humorální složky, které tvoří systém komplementu, interferony a sérové proteiny. Tento systém reaguje rychle a není ovlivněn předchozím kontaktem s patogenem²¹.

CF pacienti nejsou schopni účinně bojovat s počáteční kolonizací plic a následnou infekcí. Dochází ke zvýšení viskozity už tak hustého hlenu hromaděním DNA z rozpadlých buněk a bakterií, a tím zhoršené samočistící funkci. Buňky zánětu navíc vylučují látky, které přispívají k destrukci tkáně²². Svou roli zde možná hraje i pozměněný metabolismus NO, který se účastní nespecifické imunity a reguluje zánětlivé procesy²³.

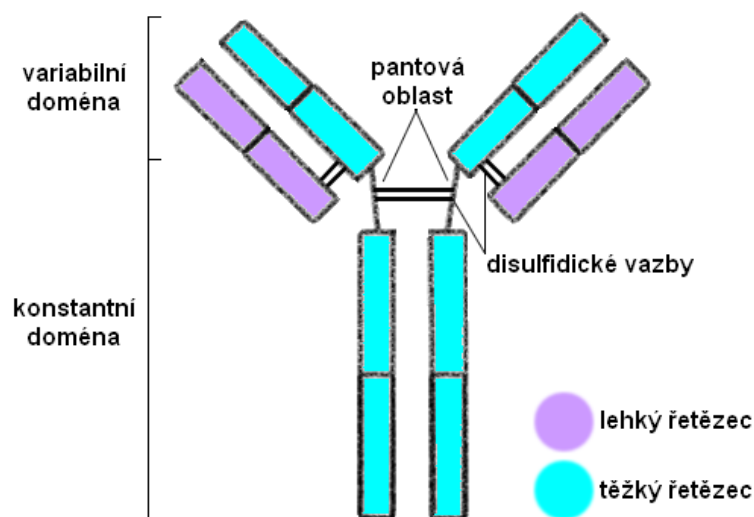
1.8.2 Specifická imunita

Adaptivní (získaná) imunita využívá mechanismy, které reagují na antigen prostřednictvím vysoce specifických molekul a jsou aktivované až po kontaktu s daným antigenem. Patří sem mechanismy zprostředkované buňkami (lymfocyty) a humorální mechanismy, které jsou založené na protilátkách. Tento systém reaguje pomaleji, k plnému rozvinutí reakce dochází v řádu dnů až týdnů. Typickým znakem těchto reakcí je tzv. imunologická paměť, tedy ovlivnění předchozím setkáním s antigenem²¹.

1.9 Protilátky

Důležitým nástrojem specifické imunitní reakce jsou protilátky. Protilátky jsou speciální molekuly bílkovinné povahy, označované též imunoglobuliny (zkráceně Ig). Jsou vylučovány plasmatickými buňkami, které vznikají aktivací B lymfocytů po vystavení danému antigenu, tedy po imunizaci. Protilátky slouží k označení cizorodých struktur, které jsou následně likvidovány makrofágy pomocí fagocytózy.

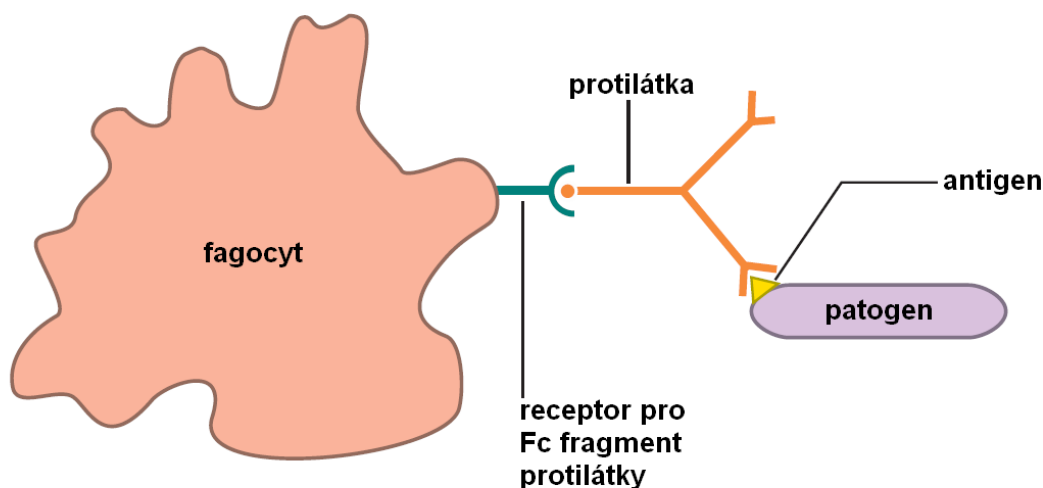
V krvi savců můžeme rozlišit pět základních tříd imunoglobulinů: IgG (tvoří asi 75 %), IgA, IgD, IgE a IgM. Struktura molekuly protilátky je homodimerní a skládá se ze čtyř polypeptidových řetězců, jejichž uspořádání je symetrické. Jedná se o dva identické lehké řetězce a dva identické těžké řetězce, které jsou mezi sebou propojeny disulfidovými vazbami. Každý řetězec obsahuje dvě odlišné domény – konstantní a variabilní. Mezi doménami na těžkých řetězcích se nachází tzv. pantová oblast. Molekula protilátky se podobá tvaru písmena Y. Dvě shodné variabilní domény na N-konci tvoří „ramena“ písmena Y a slouží ke specifické vazbě antigenu. Konstantní doména tvoří „stonek“ písmena Y a je odpovědná za efektorový mechanismus, tedy jak se bude daná protilátka po navázání patogenu chovat. Ilustrace struktury protilátky IgG je znázorněna na obrázku 3.



Obrázek 3 – Struktura protilátky IgG. Protilátka je složena ze čtyř polypeptidových řetězců (dva těžké a dva lehké) propojených disulfidickými vazbami. Variabilní domény jsou odpovědné za vazbu antigenu, konstantní doména zodpovídá za efektorový mechanismus po navázání patogenu.

Molekulu protilátky lze rozštěpit na fragmenty pomocí proteas. Působením papainu dojde k rozštěpení molekuly na dva shodné fragmenty schopné vázat antigen, tzv. Fab fragmenty (z angl. „fragment antigen binding“), a jeden fragment bez schopnosti vázat antigen, který je ovšem krystalizovatelný, díky čemuž dostal označení Fc fragment (z angl. „fragment crystallizable“).

Při boji s patogenem využívá imunitní systém procesu zvaného opsonizace. Při tomto ději dochází k navázání protilátek na povrch antigenu, čímž patogen „označí“ pro zničení imunitními buňkami. Dalo by se tedy říci, že protilátky tvoří propojovací prvek mezi patogenem a fagocytem. Patogen je přes svůj antigen navázán na Fab fragment, Fc fragment je odpovědný za vazbu na fagocyt^{24,25}. Tato situace je znázorněna na obrázku 4.



Obrázek 4 – Opsonizace. Protilátka zde funguje jako propojení mezi patogenem a fagocytem, N-koncem se váže na antigen na patogenu a C-koncem na receptor na povrchu fagocytu. Převzato a upraveno²⁴.

1.9.1 Slepičí protilátky

U ptáků lze rozlišit tři třídy imunoglobulinů: IgA, IgM a IgY. Struktury těchto protilátek jsou však rozdílné v porovnání se savčími. Ptačí IgY (z angl. „yolk Ig“) svou funkcí odpovídají savčím IgG, ve své struktuře ale postrádají pantovou oblast, což souvisí s rozdílným počtem konstantních domén. Savčí IgG je tvořena třemi konstantními doménami, ptačí IgY obsahuje navíc ještě jednu vysoce glykosylovanou konstantní doménu. Z toho vyplývá, že IgY mají vyšší molekulovou hmotnost a také vyšší podíl cukerné složky²⁶.

Ptáci vylučují protilátky do vajíčka, aby tak zajistili pasivní imunizaci embrya, u savců je tento ochranný mechanismus zajištěn protilátkami obsaženými v kolostru. IgY jsou koncentrovány ve vaječném žloutku, IgA a IgM jsou zastoupeny ve vaječném bílku²⁷.

Vaječné žloutky se zdají být výhodným zdrojem polyklonálních protilátek hned z několika důvodů. První výhodou je velká fylogenetická vzdálenost ptáků a savců, oproti savčím protilátkám jsou tedy vhodnější volbou, pokud se jedná o produkci protilátek proti vysoce konzervovaným savčím proteinům. Slepičí protilátky jsou zároveň schopné rozpoznat na savčích proteinech větší počet epitopů. Také pro efektivní vyvolání imunitní reakce stačí u slepic menší množství antigenu než u savců.

Slepičí IgY mají oproti králičím IgG horší stabilitu v kyselé oblasti a při vyšších teplotách. Při správném skladování v chladu jsou však stabilní a vykazují vysokou aktivitu i po několika letech. Jejich purifikace je navíc rychlá a snadná a lze dosáhnout vysoké čistoty. Slepice je schopna dlouhodobě produkovat velké množství protilátek, neboť snese více než 20 vajec měsíčně, přičemž jedno vejce může obsahovat až 100 mg IgY.

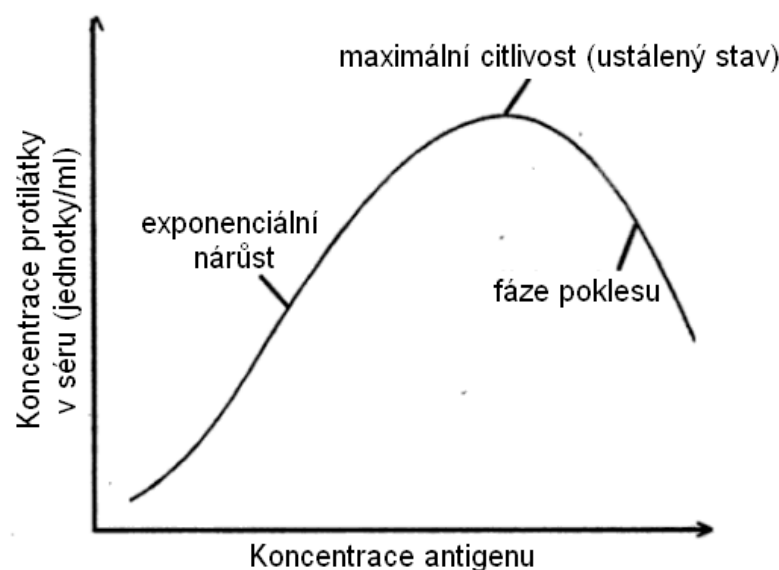
Slepičí protilátky jsou výhodné i z etického hlediska, odebírání vajec je neinvazivní, bezbolestné a slepice není nutné usmrtit. Slepice jsou zároveň celkem nenáročné na chov.

V neposlední řadě je důležité zdůraznit, že slepičí IgY v organismu nevyvolávají zánětlivou reakci, neboť neaktivují lidský komplementový systém. Navíc nereagují s revmatoidním faktorem a ani s Fc receptory, čehož lze využít např. při imunologických stanoveních^{28,29}.

Slepičí protilátky jsou vzhledem k výše uvedeným vlastnostem výhodným nástrojem pro profylaxi. Jsou vhodné i pro perorální imunoterapii, neboť vejce jsou běžnou součástí jídelníčku, IgY by tedy neměly mít žádné vedlejší účinky. Studie ukázaly, že tyto protilátky mají velký potenciál v prevenci virových a bakteriálních infekcí³⁰.

1.9.2 Produkce protilátek

Imunitní odpověď, a tedy i množství vyloučených IgG protilátek, závisí na množství podávaného antigenu. Tento trend lze popsat křivkou na obrázku 5 na straně 11. Nízké koncentrace antigenu nejsou schopny vyvolat produkci dostatečného množství lymfocytů, při vysoké koncentraci však dojde k znečitlivění lymfocytů a poklesu odpovědi. Tato imunologická pasivita se označuje jako tolerance. Je třeba si také uvědomit, že vysoký titr ve fázi maximální citlivosti nemusí být zárukou produkce protilátek s vysokou afinitou, ta bývá často vyšší právě při nižších koncentracích antigenu.



Obrázek 5 – Závislost imunitní odpovědi na množství antigenu. V první fázi dochází k exponenciálnímu nárůstu imunitní odpovědi (resp. množství protilátek vyloučených do séra) se zvyšující se koncentrací antigenu, až dojde k ustálenému stavu, kdy dochází k maximální citlivosti a nejvyšší imunitní odpovědi. Poté znovu dochází k poklesu navzdory zvyšující se koncentraci antigenu. Převzato a upraveno³¹.

Jedna imunizační dávka často nevyvolá dostatečnou imunitní odpověď a je nutné její opětovné podání v určitém časovém odstupu. Toto opětovné podání za účelem zvýšení imunitní odpovědi a produkce protilátek se označuje jako „booster“.

K imunizační směsi se často také přidávají další látky označované jako adjuvans. Tyto látky slouží ke stimulaci imunitní odpovědi. Často se také používají jako nosiče pro antigeny, které jsou malé a samy nejsou schopné vyvolat dostatečnou odpověď. Nejhojněji se využívá tzv. Freundovo adjuvans, které obsahuje emulzi minerálních olejů. Ve své kompletní formě obsahuje také usmrcené mykobakterie³¹.

Imunizované slepice jsou schopné produkovat specifické protilátky, jejichž množství závisí na druhu antigenu. Udává se, že v celkovém množství IgY ve vaječném žloutku tvoří specifická protilátka pro daný antigen přibližně 2-10 %³².

1.10 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas je početný rod pohyblivých, gramnegativních, tyčinkových bakterií, které jsou oportunními patogeny rostlin, živočichů a lidí. Jejich nejdůležitějším zástupcem, který patří mezi nejčastější původce bakteriálních infekcí a kolonizací plic pacientů s CF, je druh *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Bakterie je znázorněna na obrázku 6 na straně 12.

Tento druh bakterie se běžně vyskytuje v půdě, tlející organické hmotě a v odpadních vodách. Dobře přežívá také v nemocničním prostředí, nejčastěji na vlhkých místech, jako jsou např. umyvadla, nebulizátory, nebo dokonce i dezinfekční roztoky. Účinně na něj působí dezinfekční prostředky obsahující chlor. Široký výskyt těchto bakterií je způsoben především jejich nízkými růstovými požadavky a schopností využívat mnoho různých organických sloučenin jako zdroj uhlíku a dusíku. Řadí se mezi obligatorně aerobní bakterie, dokáží však využít i alternativní zdroje energie pro růst v anaerobních podmínkách.



Obrázek 6 – *Pseudomonas aeruginosa*. Obrázek byl pořízen skenovacím elektronovým mikroskopem. Převzato³³.

PA kolonizuje sliznice, nejčastěji způsobuje infekce dýchacího a močového ústrojí, někdy též kožní onemocnění. Napadá hostitele s oslabeným imunitním systémem, po těžkých operacích či s rozsáhlými popáleninami. Při vystavení vysoké kontaminaci může nastat kolonizace i u zdravého člověka, nedochází zde však ke vzniku onemocnění. Zvláště ohrožení jsou pacienti s CF, u kterých infekce a kolonizace plic může skončit pneumonií a smrtí.

Kolonie PA mají kovově lesklý vzhled, často dochází k částečné autolýze. Nejčastější je výskyt v R (drsne) a S (hladké) růstové fázi, u nemocných s CF se vyskytují mukózní kolonie.

1.10.1 Virulentní faktory PA

PA obsahuje velké množství virulentních faktorů, které lze rozdělit na ty, které jsou spojené s bakteriální buňkou (lipopolysacharid, extracelulární polysacharid), a ty, které jsou sekretovány jako extracelulární produkty (enzymy, pigmenty, toxiny)^{34,35}.

Lipopolysacharidy a porinové proteiny přítomné ve vnější membráně způsobují nižší propustnost pro mnoho molekul včetně antibiotik. Extracelulární polysacharid tvoří slizovou vrstvu obklopující buněčnou stěnu. Jedná se zde o vylučování alginátu, který je kopolymerem glukuronové a manuronové kyseliny. V dýchacím traktu pacientů s CF se objevují mutované kmeny, které produkují nadměrné množství alginátu, čímž dochází ke vzniku mukoidních kolonií, které jsou chráněné před obranou hostitele. Z bakteriální buňky vyčnívají pili, které hrají roli při adhezi. Pohyb bakterie je umožněn polárním bičíkem.

Bakteriální buňka do prostředí vylučuje celou řadu látek. Enzymy spojené s patogenitou jsou zejména ty s proteolytickou funkcí (elastasy, kolagenasy) a hemolytické enzymy. Důležitým virulentním faktorem PA je exoenzym S, který pozměňuje intracelulární proteiny a funguje také jako adhesin, podílí se tedy při vazbě na povrch buněk hostitele. Významnou roli ve virulenci hraje exotoxin A, který inhibuje proteosyntézu a způsobuje buněčnou smrt. Tento druh bakterie také vylučuje specifický modrý toxický pigment pyocyanin³⁶.

1.10.2 Rezistence na antibiotika

PA je velmi odolná proti řadě antibiotik. V průběhu terapie navíc může docházet k mutacím vedoucím ke zvyšování rezistence. Důležitým příkladem je mutace porinových proteinů obsažených ve vnější membráně bakteriální buňky, která vede ke snížení propustnosti látek do buňky, což může způsobit vyšší odolnost bakterie vůči více druhům antibiotik současně. Mukoidní kmeny jsou odolnější díky produkci alginátu, který slouží jako ochranná bariéra. Některá antibiotika mohou být inaktivována bakteriálními enzymy. Přirozená odolnost je navíc podpořena silnou vnější membránou, neboť se jedná o gramnegativní bakterii.

Léčba antibiotiky je problematická, účinné jsou pouze některé druhy jako např. gentamicin, imipenem nebo fluorochinoliny, ani ty však neúčinkují proti všem kmenům. Často je vyžadována kombinace více druhů antibiotik^{34,37}.

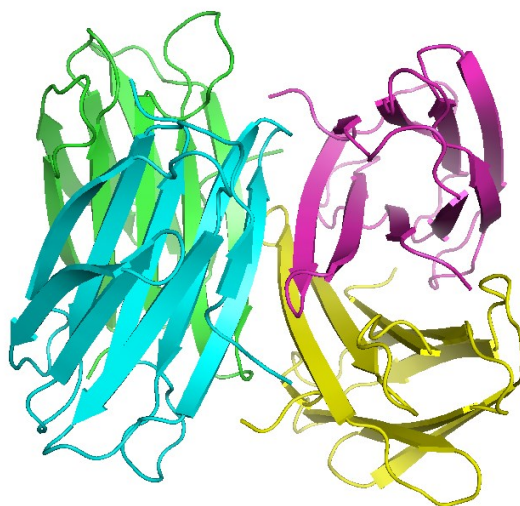
Vzhledem k tomu, že vývoj nových skupin antibiotik je velmi obtížný a problematický, zdá se jako výhodné zaměřit se na terapii, která bude cílena na mechanismy spojené s prevencí infekce, tedy hlavně na virulentní faktory, spíše než na životaschopnost bakterií jako takových. Cílem takovéto terapie je inaktivace či inhibice

virulentních faktorů bakterie (adheziny, toxiny, efektorové proteiny), výhodou je zde velké množství možných cílů zásahu³⁸.

1.10.3 Bakteriální lektiny

Mezi virulentní faktory PA se řadí dva významné lektiny, PA-IL a PA-IIL (*Pseudomonas aeruginosa* lectin I a II). Tyto lektiny patří mezi glykoproteiny, které specificky rozeznávají sacharidové struktury. Zdá se, že se účastní vazby patogenu na hostitelskou buňku a hrají významnou roli při agregaci bakterií vedoucí ke tvorbě biofilmu.

PA-IL (LecA) specificky váže D-galaktosu a PA-IIL (lecB) L-fukosu³⁹. Tyto dva lektiny mají odlišnou sekvenci aminokyselin, ale shodnou kvartérní strukturu. Skládají se ze čtyř monomerů tvořících homotetramerní komplex (obrázek 7), kde každý monomer obsahuje jedno vazebné místo pro svůj ligand, resp. sacharid.



Obrázek 7 – Struktura PAIIL. Založeno na krystalové struktuře 5A6Q z PDB (PyMOL⁴⁰).

Z toho vyplývá, že je každý tetramer schopen vázat čtyři molekuly příslušného ligandu. Oba lektiny využívají pro vazbu na sacharid vápenaté ionty a postranní řetězce aminokyselin. Vazebné místo PA-IL tvoří vápník spolu s jedinečnou sítí vodíkových vazeb, má proto vysokou specifitu pro galaktosu. PA-IIL obsahuje dva vápenaté ionty, které jsou vázány s vysokou afinitou a jsou kromě fukosy schopné vázat více různých sacharidových ligandů^{41,42}.

Jak již bylo zmíněno, pacienti s CF mají pozměněnou glykosylaci plicního epitelu. Je zde vyšší podíl sialylovaných a sulfatovaných oligosacharidů a zvýšená terminální

fukosylace, což pravděpodobně hraje významnou roli při vazbě PA-IIL⁴³. Oba lektiny navíc inhibují pohyb řasinek, čímž znemožňují efektivní čištění plic⁴⁴.

V posední době se část výzkumu zaměřuje na inhibitory PA-IL a PA-IIL. Jedná se převážně o sloučeniny obsahující ve své struktuře specifické sacharidy. Využívají se monosacharidové deriváty, vícevazebné glykoklastry a symetrické molekuly zvané dendrimery. Více vazebnost inhibitorů je pravděpodobně důležitou vlastností při prevenci vzniku biofilmů. Využívají se i tzv. glykomimetické peptidy, které mají strukturu podobnou sacharidům, je ovšem nějakým způsobem pozměněna^{45,46}.

Zajímavou alternativou jsou specifické slepičí IgY protilátky proti PA-IL a PA-IIL. Zdá se, že tyto protilátky významně snižují adhezi bakterií k plicnímu epitelu⁴⁷.

Tato práce je zaměřena právě na využití slepičích protilátek proti PA-IIL a jejich vliv na adhezi PA na buňky plicního epitelu.

2 Cíl práce

Práce je zaměřena na využití slepičích protilátek k prevenci bakteriálních onemocnění plic u pacientů s CF. Cílem práce je ověřit vliv těchto imunoglobulinů na adhezi *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu. Pro splnění tohoto cíle je třeba řešit následující dílčí úkoly:

- ověřit schopnost protilátek specificky rozeznat antigen PA-IIL metodou ELISA
- prozkoumat efekt kontrolních (preimunních) a specifických protilátek proti PA-IIL a objasnit vliv protilátek proti adjuvans obsažených v testovaných frakcích na adherenci PA na plicní epiteliální buňky
- odhalit vliv indiferentních protilátek s přítomností protilátek proti adjuvans na adherenci PA na buňky plicního epitelu
- zjistit, zda má delší časová prodleva mezi barvením buněk a expozicí bakteriím v adhezním testu vliv na bakteriální adhezi a efekt protilátek.

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie a přístroje

3.1.1 Přístroje

analytické váhy DV215CD	Ohaus, Švýcarsko
autokláv Varioklav®	H+P Labortechnik GmbH, Německo
centrifuga Eppendorf 5415 R, 5418	Eppendorf, USA
centrifuga MicroStar 12	VWR. Labogene Aps, Dánsko
centrifuga Hettich Universal 320 R	Hettich Zentrifugen, Německo
čtecí zařízení ELISA Sunrise Remote	Tecan, Švýcarsko
CO ₂ inkubátor MCO-170AIC	Panasonic Healthcare Co., Japonsko
inkubátor s funkcí třepání G24	New Brunswick Scientific, USA
laminární box BIO 126	Labox, ČR
laminární box MB 120	Labox, ČR
magnetická míchačka KMO 2 basic	IKA, Čína
mikroskop Motic AE31	Motic, Německo
mikroskop Nikon ECLIPSE TE2002-U	
s programem NIS-Elements AR 2.30	Nikon, Japonsko
minicentrifuga Spectrafuge™	Labnet, USA
pH metr HI-2211	Hanna Instruments, UK
pipetovací nástavec MidiPlus	Biohit, UK
pipetovací nástavec Pipetus	Hirschmann, Německo
předvážky 440-35A	KERN, Německo
spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro	
s programem i-control	Tecan, Švýcarsko
spektrofotometr Helios alpha	Thermo Scientific, Velká Británie
spektrofotometr Spektromom 195 D	MOM Budapest, Maďarsko
vodní lázeň	Memmert, Německo

3.1.2 Materiál

15, 50 ml plastové zkumavky	TPP, Švýcarsko
Anti-Chicken IgY (IgG)-Alkaline Phosphatase	Sigma, USA
BSA fraction V	Merck, USA
Collagen type IV from human placenta	Sigma, USA
destičky CellBind® 24 jamek	Corning, USA
dimethylsulfoxid (DMSO)	Aplichem, Německo
D-Tube™ Dialyzer Mini-Maxi (6-8 kDa, 12-14 kDa) dialyzační tuby	Novagen®, USA
FBS	Lonza Biotec s.r.o., Švýcarsko
Geneticin	Gibco™ Invitrogen, UK
Immuno Clear Standard Modules (F16, PolySorp)	Thermo Fisher Scientific, USA
jednorázové plastové sterilní pipety 1-25 ml	Corning, USA
kryozkumavky	Corning, USA
kultivační lahve 12,5-25 cm ²	TPP, Švýcarsko
kyselina octová	Lachema, ČR
LHC-9 medium	Gibco™ Invitrogen, UK
parafilm	Bemis, USA
PBS tablety (1 do 500 ml deion. vody)	Gibco™ Invitrogen, UK
Peha-Soft nitrilové rukavice bez pudru	Hartmann, ČR
pipety	Biohit, UK
PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker	
Mini Kit for General Cell Membrane labeling	Sigma, USA
PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker	
Mini Kit for general Cell Membrane Labeling	Sigma, USA
sterilní mikrofiltry 0,22 µm	Merck Millipore, Německo
špičky	Biohit, UK
trypan blue	Sigma, USA
Trypsin-EDTA Solution	Sigma, USA
TWEEN® 20	Fluka, Německo

3.2 Práce s tkáňovými kulturami

Byly použity dvě buněčné linie, CuFi-1 a NuLi-1. CuFi-1 jsou immortalizované buňky plicního epitelu pacienta s CF s mutací $\Delta F508$. NuLi-1 jsou immortalizované buňky plicního epitelu normálního pacienta. S liniemi bylo zacházeno dle produktového listu a internetových zdrojů^{48,49}.

Práce s buněčnými kulturami byla prováděna ve speciální laboratoři pro tkáňové kultury, ve sterilním prostředí v laminárním boxu MB 120, aby bylo zamezeno riziku kontaminace. Spotřební materiál (špičky k automatickým pipetám, pufry) byl sterilizován v autoklávu (121 °C, 20 min), ostatní použitý materiál (kultivační lahve, plastové zkumavky, pipety atd.) byl sterilní jednorázový.

3.2.1 Rozmrazení CuFi-1 a NuLi-1

Buněčné linie se uchovávají v hlubokomrazícím boxu (alternativou je kapalný dusík) při teplotě -80 °C. Rozmrazení musí být provedeno co nejrychleji, neboť DMSO přítomný v kryoprezervačním médiu je pro buňky částečně toxický.

Provedení:

Bylo připraveno médium s antibiotikem: LHC-9 s koncentrací Geneticinu 50 µg/ml (dále už jen „kompletní médium“). Médium bylo ponecháno vytemperovat na 37 °C. Zmrazené buňky byly přímo z hlubokomrazícího boxu vloženy do vodní lázně a rychle rozmrazeny. Poté byly převedeny do sterilní plastové zkumavky a byl k nim postupně přidáván vzrůstající objem vytemperovaného média (tabulka 1).

Tabulka 1 – Postupné přidávky média

objem buněčné suspenze [ml]	přídavek média po minutách [ml]									
	0,10	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75
1	0,10	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75
2	0,20	0,24	0,30	0,38	0,52	0,72	1,04	1,72	3,38	9,50

Buněčná suspenze byla centrifugována (5 minut, 1000 RPM, centrifuga Hettich Universal 320R) a peleta byla resuspendována v 1 ml média. Byl odebrán alikvot buněčné suspenze, který byl převeden do kultivační lahve s povrchem potaženým kolagenem (kolagen typ IV, kapitola 3.2.3) a příslušným množstvím kompletního média

(75 cm² lahev: 15-16 ml média; 25 cm²: 5-10 ml média). Nakonec byl odebrán alikvot pro určení počtu buněk a stanovení viability pomocí trypanové modři (kapitola 3.2.5).

Pozn. při rozmrazení se buňky nasazují ve vyšší koncentraci než při běžné subkultivaci.

3.2.2 Kultivace linií

Buněčné linie byly kultivovány v CO₂ inkubátoru MCO-170AIC při 37 °C a 5% CO₂. Kultivace probíhala v kultivačních lahvích (75 cm²) potažených kolagenem IV, který podporuje správný růst používaných kultur. Bylo užíváno LHC-9 médium, které neobsahuje fetální bovinní sérum a je navrženo speciálně pro plicní epiteliální buňky. Do média bylo přidáváno antibiotikum Geneticin o koncentraci 50 µg/ml.

3.2.3 Příprava kultivačních lahví potažených kolagenem

Byl použit lyofilizovaný kolagen IV z lidské placenty. Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním komerčního preparátu v 0,25% (v/v) kyselině octové tak, aby vznikl roztok o koncentraci 1,8 mg/ml.

Zásobní roztok byl ředěn pomocí PBS na výslednou koncentraci 60 µg/ml a přefiltrován přes 0,22 µm filtr do sterilní nádoby. Takto zředěný roztok byl nanášen do kultivačních lahví v takovém objemu, aby pokryl celý kultivační povrch: 4-5 ml roztoku kolagenu do 75 cm² lahve, 2 ml roztoku kolagenu do 25 cm² lahve. Lahve byly ponechány inkubovat v laminárním boxu při laboratorní teplotě do druhého dne (12-18 h).

Poté byl roztok kolagenu odstraněn a povrch byl promyt 3x 4 ml PBS. Lahve byly ponechány vyschnout dnem vzhůru s povoleným uzávěrem. Potom byly lahve nejméně 2 h sterilizovány UV zářením. Uzávěr byl zajištěn parafilmem a lahve byly skladovány při 4 °C.

Před použitím byl povrch znovu promyt cca 4 ml PBS.

3.2.4 Subkultivace buněčných linií

Subkultivace je pravidelný úkon při práci s buněčnými liniemi. Jde o převedení části původní buněčné suspenze do nové kultivační lahve s čerstvým médiem z důvodu snížení hustoty buněk.

V průběhu kultivace u adherentních linií dochází ke tvorbě monovrstvy. Uvolnění přisedlých buněk je docíleno působením trypsinu s EDTA, k zastavení je následně užíváno

FBS. Četnost provedení subkultivace závisí na počtu nasazených buněk, rychlosti jejich růstu a schopnosti vytvořit monovrstvu.

Subkultivace byla prováděna po 7 dnech. Výměna média je nutná každé 2-3 dny. Po rozmrazení je pro tyto linie doporučeno maximálně 15 subkultivací z důvodu zachování deklarovaných vlastností.

Provedení:

Od buněk bylo odebráno původní kultivační médium. Byly přidány 2-3 ml 0,25% trypsinu s EDTA (0,53mM), trypsin byl ponechán působit po dobu 8 min v inkubátoru při 37 °C. Uvolnění buněk bylo kontrolováno mikroskopicky. Působení trypsinu bylo zastaveno ekvivalentním množstvím 1% (v/v) FBS (2-3 ml). Kultivační povrch byl důkladně opláchnut pomocí pipety roztokem s buněčnou suspenzí, který byl převeden do centrifugační zkumavky. Centrifugace probíhala 5 min při 1000 RPM (Hettich Universal 320R). Poté byl odstraněn supernatant a peleta byla resuspendována v 1 ml kompletního média. Z této základní suspenze byl odebrán alikvot pro další kultivaci (75-150 µl) do nových kultivačních lahví potažených kolagenem s vytemperovaným kompletním médiem. Byl také odebrán alikvot pro určení počtu buněk a stanovení jejich viability.

3.2.5 Určení počtu a viability buněk pomocí trypanové modři

Určení počtu a viability buněk se provádí v hemocytometru (označovaném též jako Bürkerova komůrka) s pomocí mikroskopu. Poměr buněčné suspenze ku roztoku trypanové modři je 1:1.

Provedení:

Ze zásobní buněčné suspenze byl do mikrozkušavky odebrán alikvot, který byl vhodně zředěn médiem na objem 20 µl (většinou 5x). K němu bylo přidáno ekvivalentní množství 0,4% (w/v) trypanové modři. Ze směsi bylo odebráno 20 µl a nanášeno na mřížku Bürkerovy komůrky, která byla umístěna pod mikroskop.

Bürkerova komůrka obsahuje mřížku sestávající z devíti velkých čtverců. Při počítání bylo využito pět z nich (čtyři rohové a jeden uprostřed) kvůli statistickému vyhodnocení.

Trypanová modř zároveň slouží jako indikátor viability, mrtvé buňky totiž lyzují a jsou obarveny modře, což lze okem lehce rozeznat.

Koncentraci buněk v suspenzi určuje vztah:

$$c \text{ [b/ml]} = \frac{\text{celkový spočítaný počet buněk}}{\text{počet počítaných čtverců}} \cdot \text{ředění vzorku} \cdot 10\,000.$$

3.3 Práce s *Pseudomonas aeruginosa*

Byl použit sbírkový (kontrolní) kmen bakterií PA označený jako PAK (ST 1763).

Bakterie byly uchovávány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C. Práce s nimi probíhala asepticky v laminárním boxu BIO 126 nebo v přítomnosti plamene.

3.3.1 Rozmrazení a kultivace PAK

Mikrozkumavka s hlubokozmrazenou bakteriální suspenzí byla vyjmuta z -80 °C a rozmrazena za laboratorní teploty. Do 50ml plastové zkumavky bylo pomocí injekční stříkačky přeneseno 5 ml kompletního média (PS médium): 1,6% (w/v) pepton, 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát, 0,5 % (v/v) glycerol, 57 mM K₂SO₄, 15 mM MgCl₂S (sterilizováno v autoklávu). Do média bylo přeneseno 15 µl bakteriální suspenze.

Kultivace probíhala přes noc v inkubátoru při 37 °C za konstantního třepání (střední otáčky, New Brunswick Scientific G24).

3.3.2 Zamrazení PAK

Bakterie namnožené v PS médiu byly rozděleny do alikvotů po 100 µl do mikrozkumavek. K bakteriální suspenzi bylo přidáno 100 µl kryoprezervačního média: 40% (w/v) glycerol v PBS (sterilizováno přes 0,22 µm mikrobiální filtr). Směs byla rychle zmrazena v kapalném dusíku a mikrozkumavky byly vloženy do hlubokomrazícího boxu.

3.3.3 Určení množství bakteriálních buněk v suspenzi

Množství bakteriálních buněk v suspenzi bylo určováno fotometricky pomocí optické denzity, tedy absorbance při 600 nm (OD₆₀₀). Koncentrace 6·10⁸ bakterií/ml odpovídá OD₆₀₀ = 1.

3.4 Fluorescenční značení

Plicní epitelální buňky (CuFi-1 a NuLi-1) byly značeny pomocí zeleného fluorescenčního barviva PKH67, které má excitační maximum při 490 nm a emisní maximum při 502 nm. Bakterie byly značeny pomocí oranžového fluorescenčního barviva PKH26, které má excitační maximum při 551 nm a emisní maximum při 567 nm.

Jedná se o sloučeniny, které se svými dlouhými alifatickými řetězci váží do buněčné membrány. Barviva se rozpouštějí v Diluentu C, který je součástí balení.

Výrobce deklarovaný poločas přetrvání fluorescence je 10-12 dní u PKH67 a několik týdnů u PKH26. Značení bylo prováděno dle produktového listu upraveného podle Mgr. Libuše Noskové⁵⁰.

3.4.1 Fluorescenční značení plicních epitelálních buněk pomocí PKH67

Pro značení pomocí této sloučeniny je nutné převést buňky do suspenze. Toho je dosaženo subkultivací (kapitola 3.2.4).

Buněčná suspenze byla centrifugačně promyta 4 ml PBS (5 minut, 1000 RPM, centrifuga Hettich Universal 320R). Po opatrném odebrání supernatantu byla peleta resuspendována v 250-500 μ l Diluentu C (záleží na množství buněk, většinou 250 μ l na 1 kultivační lahev). K suspenzi byl přidán 8 μ M roztok PKH67 rozpuštěného v Diluentu C (2 μ l PKH67 a 248 μ l Diluentu C) a směs byla důkladně promíchána pipetou. Inkubace probíhala 5 min při laboratorní teplotě bez přístupu světla (ve zkumavce obalené alobalem).

Reakce byla zastavena 1 ml FBS a směs byla promíchána. Buněčná suspenze byla centrifugována 10 min při 1000 RPM (centrifuga Hettich Universal 320R). Peleta byla resuspendována v 5 ml média (LHC-9) a centrifugována 5 minut při 1000 RPM (centrifuga Hettich Universal 320R). Poté byly buňky ještě 2x centrifugačně promyty médiem. Peleta byla nakonec resuspendována v 1 ml média (základní suspenze). Z této buněčné suspenze byl odebrán alikvot na počítání a stanovení viability buněk.

Fluorescence byla měřena na spektrofleurimetru Tecan Infinite M200 Pro při vlnových délkách excitace 470 nm a emise 505 nm. Bylo nastaveno spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky (vyplněný kruh 4x4), parametr „gain“ byl nastavován automaticky. Dále byla fluorescence buněk sledována na mikroskopu Nikon Eclipse, filtr 31001 FITC C87701.

3.4.2 Fluorescenční značení bakterií pomocí PKH26

Bakteriální kmen PAK byl kultivován přes noc v kompletním (PS) médiu v inkubátoru při 37 °C za konstantního třepání.

Bakteriální suspenze byla centrifugována 5 min při 12000 RPM (Eppendorf Centrifuge 5415R). Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 1 ml PBS. Byla změřena optická densita při 600 nm (OD_{600}) a určen počet bakterií v suspenzi. Poté bylo odebráno potřebné množství pro fluorescenční značení.

Odebrané množství bakteriální suspenze bylo centrifugováno 5 min při 12000 RPM (Eppendorf Centrifuge 5415R). Supernatant byl pečlivě odebrán a peleta byla resuspendována ve 250 μ l Diluentu C. K suspenzi byl přidán 20 μ M roztok PKH26 rozpuštěného v Diluentu C (4 μ l PKH67 a 246 μ l Diluentu C) a směs byla důkladně promíchána pipetou. Inkubace probíhala 30 min při laboratorní teplotě bez přístupu světla (ve zkumavce obalené alobalem).

Reakce byla zastavena přidavkem 150 μ l 1% (w/v) BSA a směs byla promíchána. Poté byla zkumavka doplněna roztokem BSA do 1,5 ml. Směs byla centrifugována 10 min při 13000 RPM (Eppendorf Centrifuge 5415R). Byl odebrán supernatant a peleta byla dvakrát centrifugačně promyta 1 ml PBS (7,5 min a 5 min, 12000 RPM, Eppendorf Centrifuge 5415R). Nakonec byla peleta resuspendována v 1 ml PBS (výchozí bakteriální suspenze).

Fluorescence byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro při vlnových délkách excitace 522 nm a emise 569 nm. Bylo nastaveno spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky (vyplněný kruh 4x4) a parametr „gain“ na 140. Dále byla fluorescence sledována na mikroskopu Nikon Eclipse, filtr 31002 RdiI C87702.

3.5 Adhezní test

Metodou adhezního testu byl studován vliv slepičích protilátek připravených proti lektinu PA na schopnost adheze bakterie na plicní epiteliální buňky. Práce navazovala na předchozí výzkum role lektinu PA-IIL. Metodika byla převzata^{50,51}.

Jako modelový systém plicní tkáně byly využity buněčné linie CuFi-1 a NuLi-1 (kapitola 3.2). Buňky byly fluorescenčně značeny pomocí barviva PKH67. Dále byl použit kontrolní kmen *Pseudomonas aeruginosa*, PAK, který byl fluorescenčně označen pomocí barviva PKH26. Bylo provedeno studium adheze bakterie na plicní epiteliální buňky v přítomnosti vs. nepřítomnosti protilátek. Pro vyhodnocení byl vypočten poměr relativní fluorescence bakterií vztažený na fluorescenci buněk.

Provedení:

Ze zásobní suspenze obarvených buněk (kapitola 3.4.1) byl odebrán alikvot pro určení počtu buněk v suspenzi (kapitola 3.2.5.). Do 24-jamkové destičky Corning CellBind bylo pipetováno vytemperované médium v objemu 750 μ l/jamka. Do média bylo vneseno příslušné množství buněčné suspence, aby bylo dosaženo množství $5,5 \cdot 10^5$ buněk/jamka. Buňky byly ponechány v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂) po dobu 24-48 h, aby došlo k vytvoření konfluentní vrstvy a regeneraci po barvení.

PAK byly rozmrazeny a inokulovány do kompletního média. Kultivace probíhala přes noc při 37 °C za konstantního třepání (kapitola 3.3.1).

Roztoky protilátek byly dialýzou proti PBS zbaveny azidu sodného, který byl použit pro jejich konzervaci a pro buňky je toxický. Dialýza probíhala v 5 l PBS přes noc při 4 °C za mírného míchání. Pufr byl 1x vyměněn. Po dialýze byla změřena absorpance proteinů (protilátek) v roztoku při vlnové délce 280 nm (A_{280}). Koncentrace protilátky byla vypočtena podle vztahu:

$$c = A_{280} \cdot \text{ředění} \cdot 1,094^*.$$

*experimentálně stanovený parametr

Výsledná koncentrace protilátky v jamce byla vždy 1 mg/ml.

Byly použity protilátky ze zvířete před imunizací, označené jako kontrolní (K), a protilátky specifické (S) od zvířete po imunizaci.

Bakterie byly po rozmrazení a kultivaci fluorescenčně označeny (kapitola 3.4.2) a bylo stanoveno jejich množství v suspenzi změřením OD₆₀₀ (kapitola 3.3.3). Počet bakterií na jamku byl 100x vyšší než počet buněk, tzn. $5,5 \cdot 10^7$ bakterií/jamka.

Byly připraveny suspenze ve složení:

- a) pro neošetřené buňky (bez protilátky): PAK v množství $5,5 \cdot 10^7$ bakt./jamka; PBS
- b) pro buňky ošetřené protilátkou: PAK v množství $5,5 \cdot 10^7$ bakt./jamka; roztok protilátky (kontrolní/specifická) o koncentraci 1 mg/ml; PBS.

Adherované plicní buňky byly po vytvoření konfluentní vrstvy na dně jamek promyty od média roztokem PBS. Po promytí byla na buňky nanesena příslušná bakteriální suspenze (bez nebo s protilátkou) o objemu 300 μ l/jamka. Destička byla ponechána inkubovat 2 h při laboratorní teplotě bez přístupu světla (v alobalu). Nenavázané bakterie byly z jamek odstraněny promytím PBS. Objemy PBS byly 1x 500 μ l a 2x 350 μ l. Nakonec byly buňky před měřením převrstveny 100 μ l PBS.

Fluorescence byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 v programu i-Control: spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky (vyplněný kruh 4x4), parametr „gain“ byl nastaven na 140 (PKH26)/ nastaven automaticky (PKH67), vlnové délky 522/569 nm (PKH26), Ex/Em: 470/505 nm (PKH67).

Situace v jednotlivých jamkách byly následně dokumentovány mikroskopem Nikon Eclipse s využitím programu NIS-Elements AR 2.30. Pro úpravu snímků a vnášení barvy byl využit program ImageJ.

3.6 ELISA

ELISA (z angl. „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) patří mezi imunochemické metody založené na interakci protilátky s antigenem. Tímto postupem lze kvantifikovat jejich koncentrace.

Imobilizovaný antigen v jamce mikrotitrační destičky je specificky rozpoznán primární protilátkou, na níž se následně váže sekundární protilátka s navázaným enzymem. Tento enzym katalyzuje konverzi chromogenního substrátu na barevný produkt, který lze fotometricky detekovat. Míra absorbance odpovídá koncentraci sekundární, resp. primární protilátky.

V této práci byla metoda využita pro ověření reaktivity protilátek proti PA-IIL uchovávaných několik let ve 4 °C v PBS s azidem sodným.

Jako antigen byl použit rekombinantní PA-IIL dvou druhů: ΔG/fuc s mutací snižující afinitu pro fukosu a PA-IIL modifikovaný diazomethanem (PA-IIL DAM).

Použité roztoky:

- *PBS-ELISA*: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2
- *imobilizační pufr*: 13 mM Na₂CO₃; 25 mM NaHCO₃; pH 9,6
- *PBS-ELISA + Tween*: 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 0,134 M NaCl; 0,1% (v/v) TWEEN 20[®]; pH 7,2
- *blokovací roztok*: 2% (w/v) řídský bílek v *PBS-ELISA + Tween*
- *vyvolávací roztok pro alkalickou fosfatasu*: 30 mM NaHCO₃; 20 mM Na₂CO₃; 1 mM MgCl₂; 0,1% *p*-nitrofenolfosfát
- *zastavovací roztok po AP*: 3 M NaOH

Provedení:

Do jamek mikrotitrační destičky PolySorp bylo naneseno po 100 µl roztoku antigenu PA-III v *imobilizačním pufru* o koncentraci 4 µg/ml. Inkubace probíhala přes noc při 4 °C. Po inkubaci byly jamky 3x promyty 200 µl *PBS-ELISA + Tween*.

Následovalo blokování jamek pomocí 150 µl 2% (w/v) roztoku řidkého bílku v *PBS-ELISA + Tween* po dobu 1 h při 37°C. Jamky byly 3x promyty 200 µl *PBS-ELISA + Tween*.

Do jamek byly naneseny roztoky primární protilátky v *PBS-ELISA* o koncentracích: 90; 30; 10 a 3,3 µg/ml. Inkubace probíhala 2 h při 37 °C. Jamky byly následně opět 3x promyty 200 µl *PBS-ELISA + Tween*.

Do jamek bylo naneseno 100 µl sekundární protilátky naředěné 1:1600 v *PBS-ELISA* (8 µl protilátky ve 12 ml *PBS-ELISA*). Inkubace probíhala 1 h při 37 °C. Jamky byly 3x promyty 200 µl *PBS-ELISA + Tween*.

Do každé jamky bylo přidáno 100 µl *vyvolávacího roztoku*, reakce byla zastavena po 10 min přidáním 100 µl 3M roztoku NaOH.

Absorbance při vlnové délce 405 nm byla měřena na přístroji Tecan Sunrise Remote.

4 Výsledky

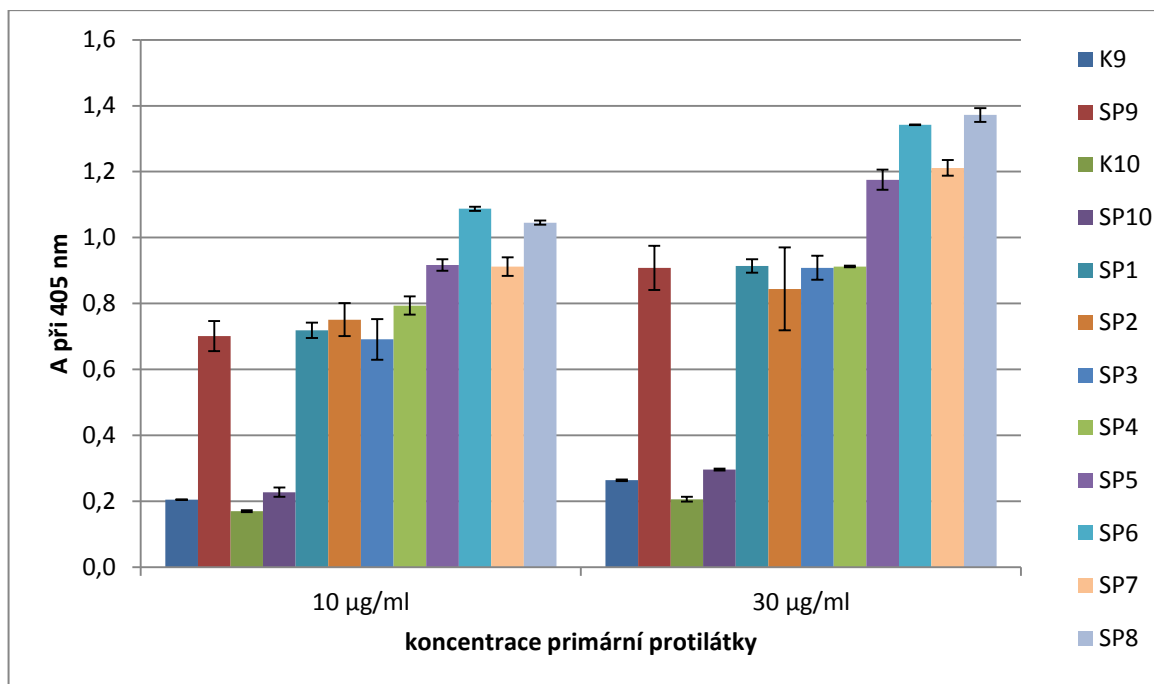
4.1 ELISA

4.1.1 Reaktivita protilátek vůči PA-IIL

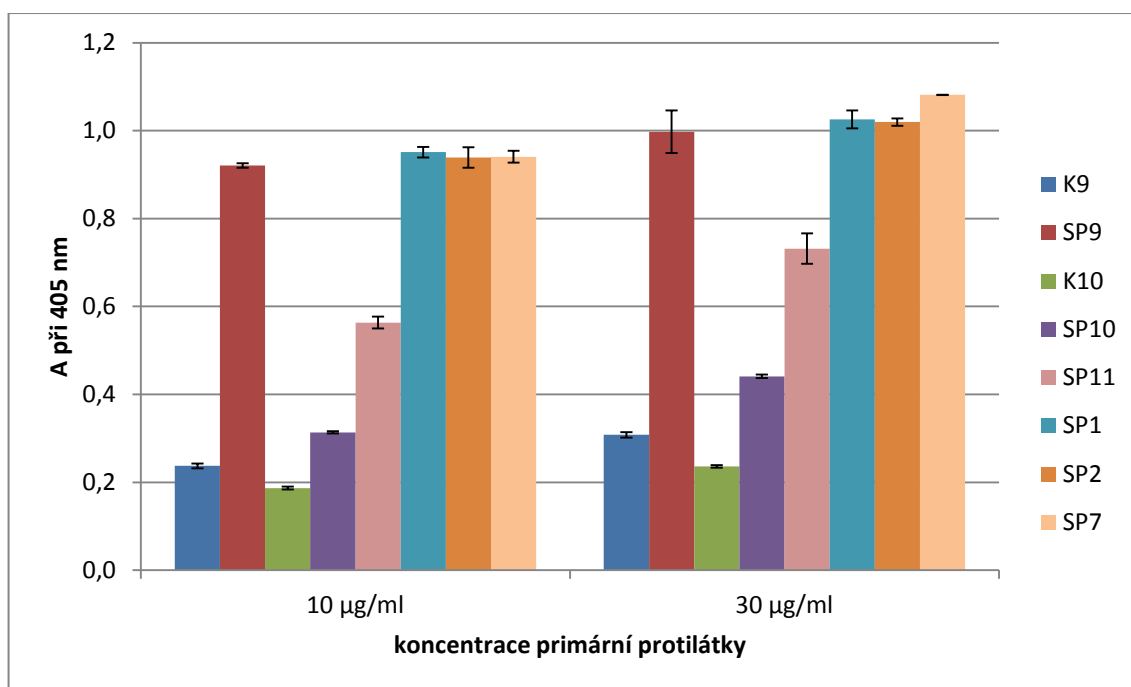
Specifické rozeznání antigenu protilátkami proti lektinu PA-IIL bylo ověřeno metodou ELISA. Byl použit rekombinantní PA-IIL Δ G/fuc a PA-IIL DAM. Antigen byl nanášen v koncentraci 0,4 μ g/jamka. Pro detekci byla použita sekundární protilátka proti slepičí protilátce značená alkalickou fosfátasou.

Byly testovány frakce specifických protilátek proti PA-IIL (SP1-8) uchovávaných několik let při 4 °C. Pro porovnání byly dále testovány nově připravené specifické protilátky proti PA-IIL (SP10, SP11) spolu s kontrolní (preimunní) protilátkou (K10). Protože v adhezních testech byla využívána specifická protilátka SP9 a kontrolní protilátka K9, byly tyto protilátky též zařazeny do testovaného souboru.

Jako imunogeny sloužily dva různě modifikované lektiny: PA-IIL Δ G/fuc a PA-IIL DAM. Modifikace lektinu (u PA-IIL Δ G/fuc mutací, u PA-IIL DAM esterifikací) se provádí za účelem snížení účinnosti vazby sacharidu. Nové frakce protilátek SP10 a SP11 byly získány imunizací lektinem PA-IIL Δ G/fuc. Frakce protilátek SP1-8 byly získány imunizací lektinem PA-IIL DAM. Výsledky pro antigen PA-IIL Δ G/fuc jsou znázorněny na obrázku 8, pro PA-IIL DAM na obrázku 9. Obrázky jsou znázorněny na straně 29.



Obrázek 8 – Stanovení imunoreaktivity specifických a kontrolních protilátek proti PA-IIL metodou ELISA. Závislost naměřených hodnot absorbance při 405 nm na použitých koncentracích primárních protilátek: kontrolní (K9, K10) a specifické (SP9, SP10, SP1-8). Jako antigen byl použit rekombinantní PA-IIL ΔG/fuc v koncentraci 0,4 μg/jamka.



Obrázek 9 – Stanovení imunoreaktivity specifických a kontrolních protilátek proti PA-IIL metodou ELISA. Závislost naměřených hodnot absorbance při 405 nm na použitých koncentracích primárních protilátek: kontrolní (K9, K10) a specifické (SP9, SP10, SP11, SP1, SP2, SP7). Jako antigen byl použit rekombinantní PA-IIL DAM v koncentraci 0,4 μg/jamka.

4.2 Adhezní testy

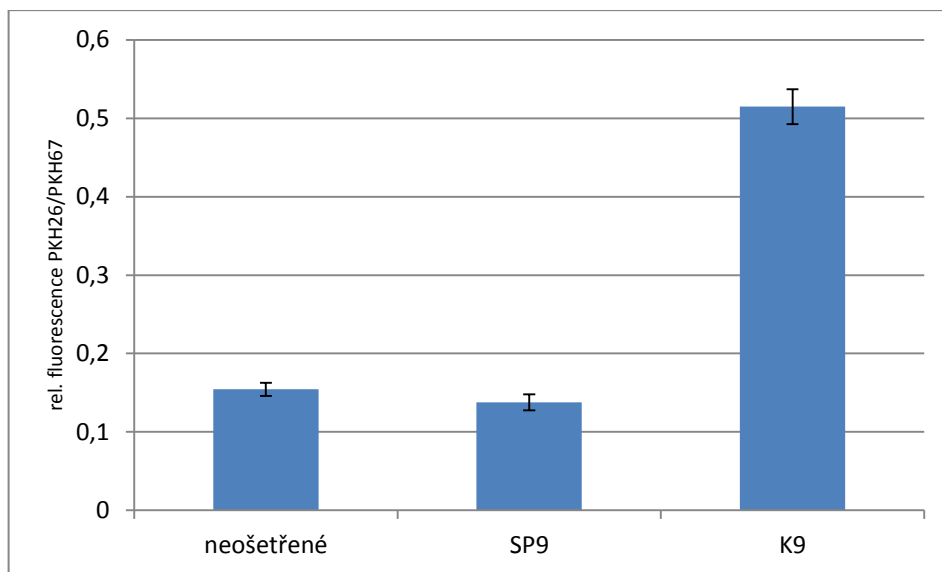
Byl sledován vliv protilátek z vaječných žloutků na adhezi PAK na plicní epiteliální buňky. Cílem bylo ověření vlivu specifických protilátek proti lektinu PA-IIL v porovnání s dalšími složkami imunoglobulinových frakcí, získaných imunizací v přítomnosti adjuvans, na adhezi bakterií. Dále byl sledován vliv časové prodlevy mezi barvením epiteliálních buněk a jejich expozicí bakteriím při adhezním testu.

Byly použity jak specifické (S) protilátky od slepic imunizovaných lektinem PA-IIL, tak protilátky od slepic imunizovaných peptidovými antigeny na KLH (z angl. „keyhole limpet hemocyanin”) označené jako indiferentní protilátky. Jako kontroly (K) sloužily protilátky před imunizací daného zvířete.

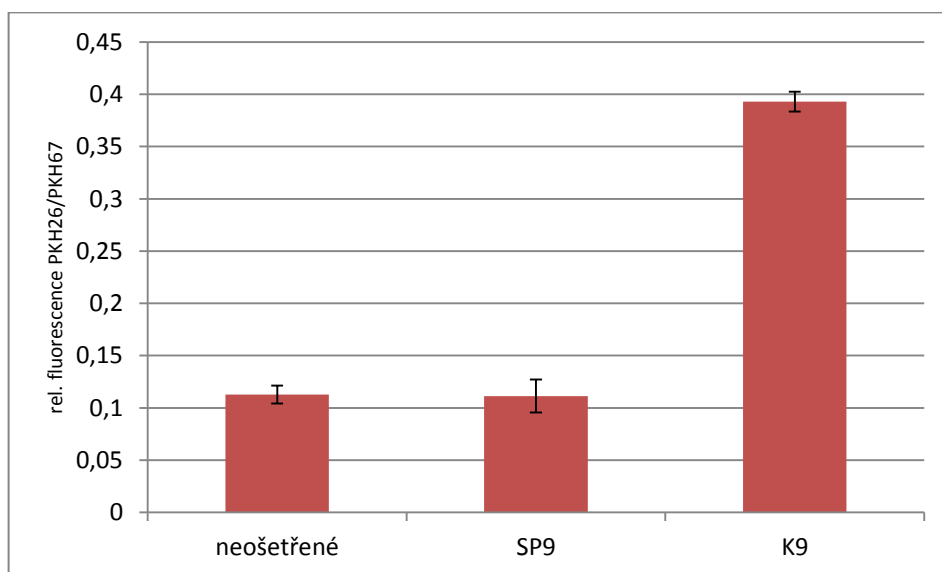
Bakterie (PAK) a plicní epiteliální buňky (CuFi-1, NuLi-1) byly vizualizovány a kvantifikovány fluorescenčním barvením pomocí sloučenin PKH (bakterie: PKH26, plicní buňky: PKH67). Pro vyhodnocení byl vypočten poměr relativní fluorescence bakterií vztažený na fluorescenci buněk.

4.2.1 Ověření vlivu anti-PA-IIL protilátky na adhezi PAK

Byla sledována schopnost specifické protilátky proti PA-IIL (SP9) ovlivňovat bakteriální adhezi na buňky plicního epitelu. Byl porovnán efekt specifické protilátky vůči kontrolní protilátce (K9). Dále byl sledován rozdíl těchto efektů u buněčných linií CuFi-1 (obrázek 10) a NuLi-1 (obrázek 11). Obrázky jsou znázorněny na straně 31.



Obrázek 10 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1. Byl použit kontrolní kmen bakterií PAK. Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven na 140) na fluorescenci buněk CuFi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven automaticky) pro reakční směsi: specifická protilátka (SP9), kontrolní protilátka (K9), neošetřené (bez přidavku protilátek). Od hodnot rel. fluorescence byla odečtena hodnota fluorescence pozadí (bakterie: 1258; buňky: 2695). Adhezní test byl proveden 1 den po barvení buněk.

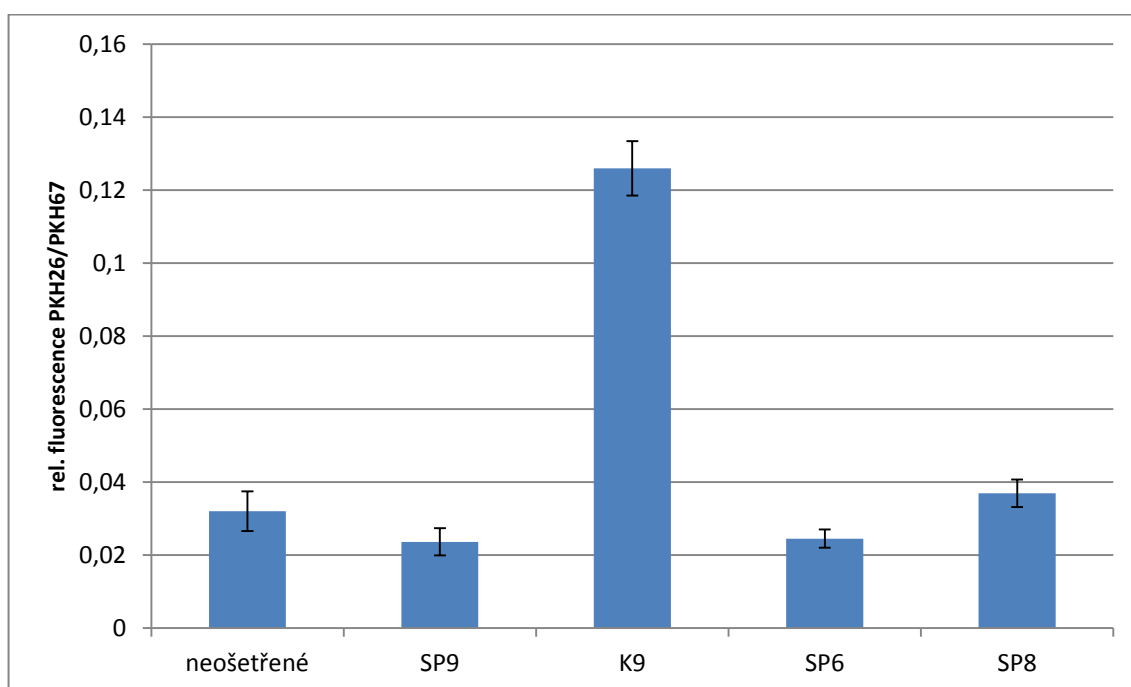


Obrázek 11 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1. Byl použit kontrolní kmen bakterií PAK. Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven na 140) na fluorescenci buněk CuFi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven automaticky) pro reakční směsi: specifická protilátka (SP9), kontrolní protilátka (K9), neošetřené (bez přidavku protilátek). Od hodnot rel. fluorescence byla odečtena hodnota fluorescence pozadí (bakterie: 1187; buňky: 4356). Adhezní test byl proveden 1 den po barvení buněk.

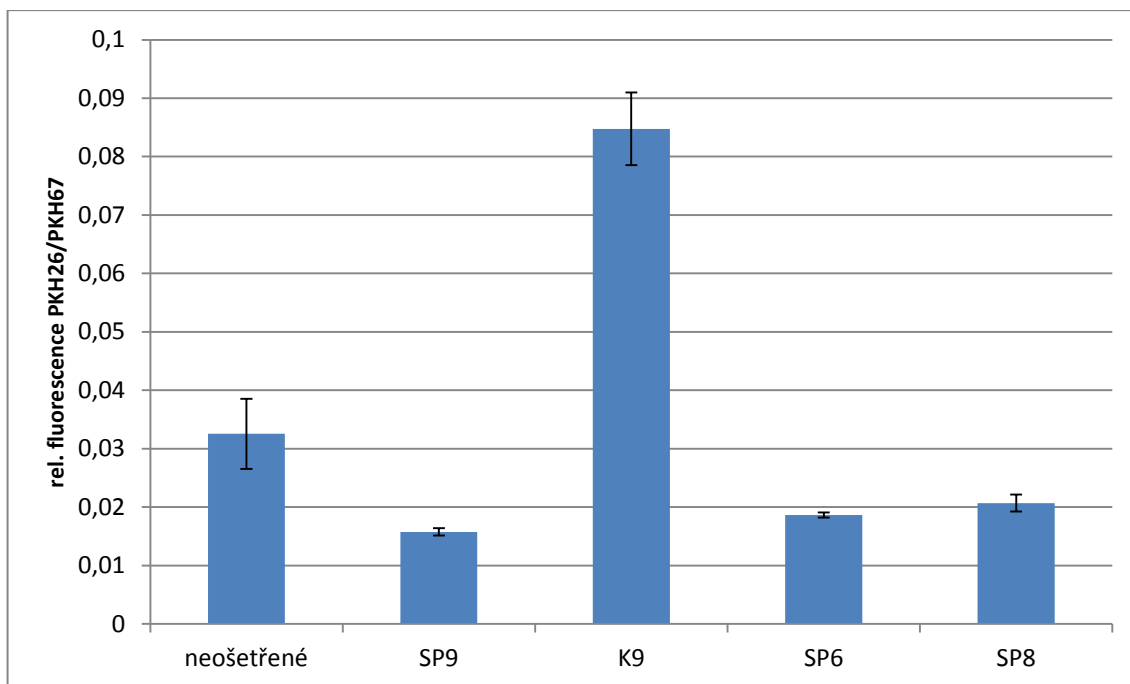
4.2.2 Vliv časové prodlevy po barvení buněk na adhezi bakterií

Byl sledován vliv časové prodlevy (1 a 2 dny) po barvení plicních epiteliálních buněk CuFi-1 na hodnotu fluorescence, dále také vliv této časové prodlevy na bakteriální adhezi. Na obrázku 12 je znázorněna relativní adherence PAK na buňky 1 den po barvení buněk. Na obrázku 13 na straně 33 je znázorněna stejná situace, tentokrát 2 dny po barvení buněk. Byl zde též porovnáván vliv specifických anti-PA-IIL od různých slepic na adhezi PA.

Byly porovnány hodnoty fluorescence buněk 1 den a 2 dny po obarvení. Při měření za stejných podmínek byla zjištěna přibližně 1,2x vyšší fluorescence u déle obarvených buněk. Bakteriální adheze byla vyšší první den a efekt specifických protilátek byl výraznější 2. den po obarvení.



Obrázek 12 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1. Byl použit kontrolní kmen bakterií PAK. Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven na 140) na fluorescenci buněk CuFi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven automaticky) pro reakční směsi: specifické protilátky (SP9, SP6, SP8), kontrolní protilátka (K9), neošetřené (bez přidavku protilátek). Od hodnot rel. fluorescence byla odečtena hodnota fluorescence pozadí (bakterie: 1121; buňky: 2923). Adhezní test byl proveden 1 den po barvení buněk.

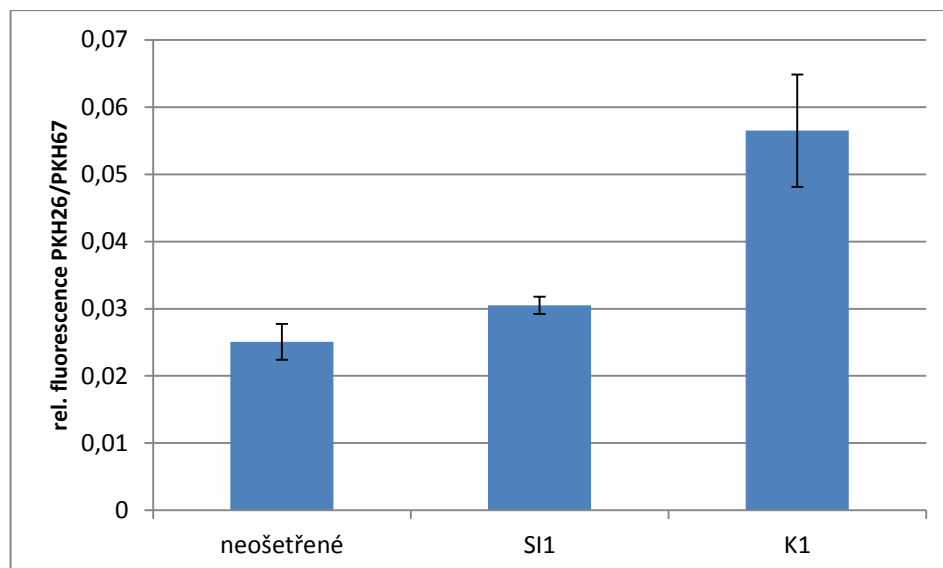


Obrázek 13 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1. Byl použit kontrolní kmen bakterií PAK. Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven na 140) na fluorescenci buněk CuFi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven automaticky) pro reakční směsi: specifické protilátky (SP9, SP6, SP8), kontrolní protilátka (K9) neošetřené (bez přidavku protilátek). Od hodnot rel. fluorescence byla odečtena hodnota fluorescence pozadí (bakterie: 1186; buňky: 2354). Adhezní test byl proveden 2 dny po barvení buněk.

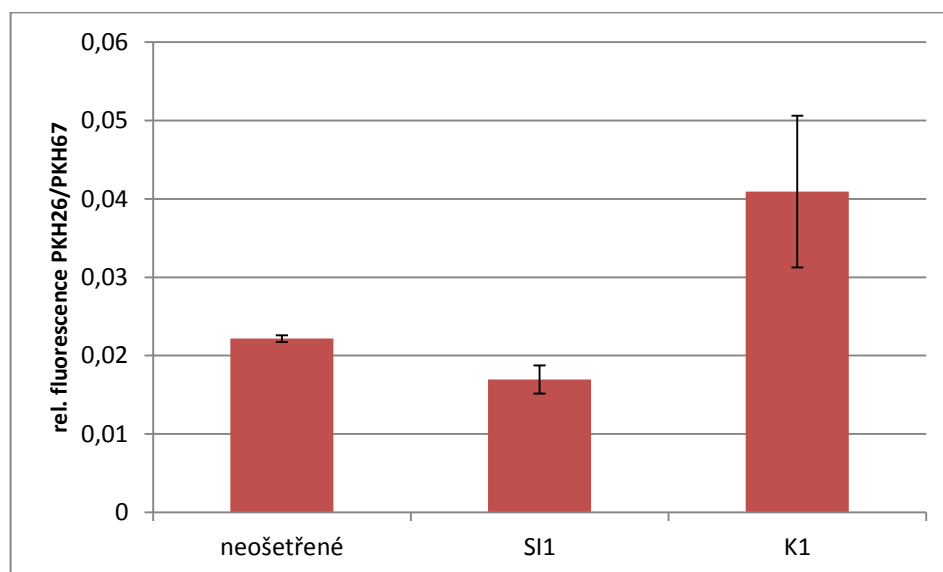
4.2.3 Vliv indiferentních protilátek na adhezi PA

Byly použity indiferentní protilátky od slepic imunizovaných KLH s navázanými peptidovými antigeny získané shodným způsobem imunizace, jakým byly získány specifické protilátky proti PA-IIL použité v ostatních experimentech. Byl sledován vliv těchto protilátek na bakteriální adhezi (obrázky 14 a 15, strana 34). Jako kontrolní (K) sloužily protilátky před imunizací daného zvířete.

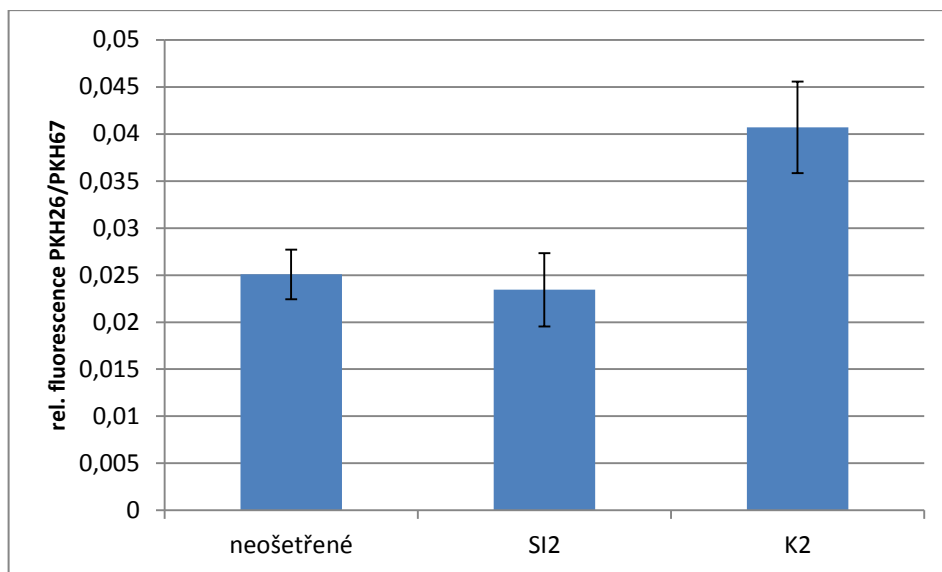
Dále je zde opět sledován vliv časové prodlevy (1 a 2 dny) na adhezi bakterií. Obrázky 16 a 17 (strana 35) znázorňují relativní adhezi PAK na buňky 1 den po barvení buněk. Obrázky 18 a 19 (strana 36) znázorňují relativní adhezi PAK na buňky 2 dny po barvení buněk.



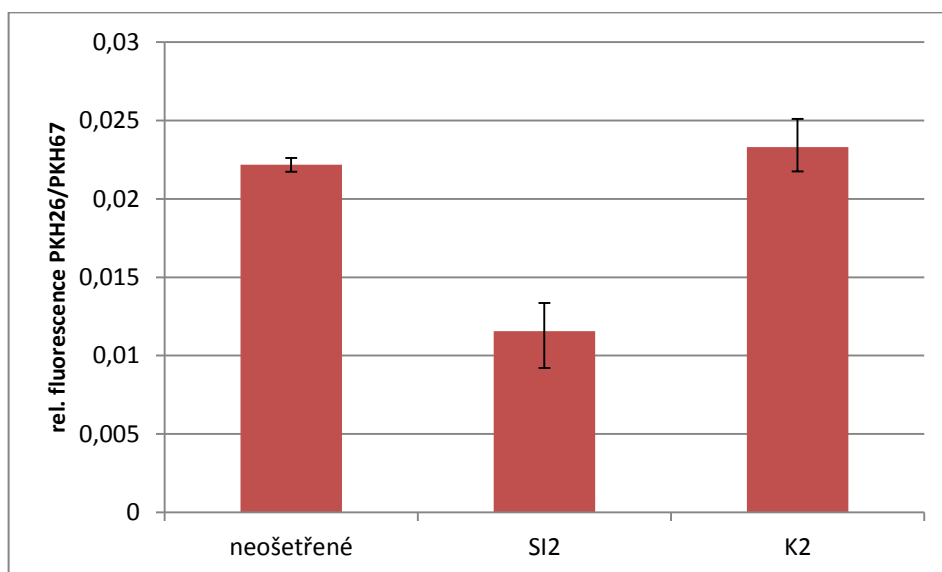
Obrázek 14 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1. Byl použit kontrolní kmen bakterií PAK. Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven na 140) na fluorescenci buněk CuFi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven automaticky) pro reakční směsi: indiferentní protilátka (SI1), kontrolní protilátka (K1), neošetřené (bez přidavku protilátek). Od hodnot rel. fluorescence byla odečtena hodnota fluorescence pozadí (bakterie: 1089; buňky: 4668). Adhezní test byl proveden 1 den po barvení buněk.



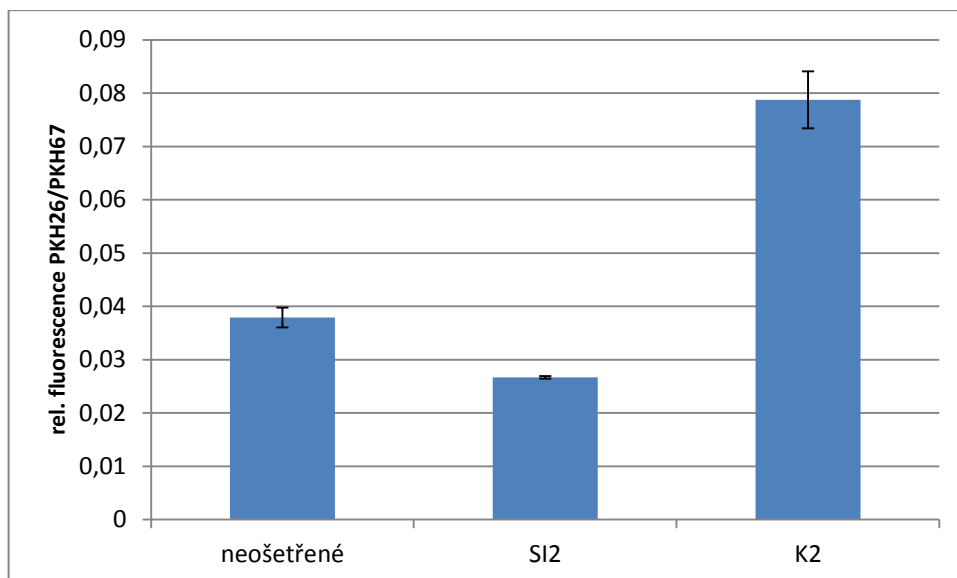
Obrázek 15 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1. Byl použit kontrolní kmen bakterií PAK. Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven na 140) na fluorescenci buněk NuLi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven automaticky) pro reakční směsi: indiferentní protilátka (SI1), kontrolní protilátka (K1), neošetřené (bez přidavku protilátek). Od hodnot rel. fluorescence byla odečtena hodnota fluorescence pozadí (bakterie: 1152; buňky: 897). Adhezní test byl proveden 1 den po barvení buněk.



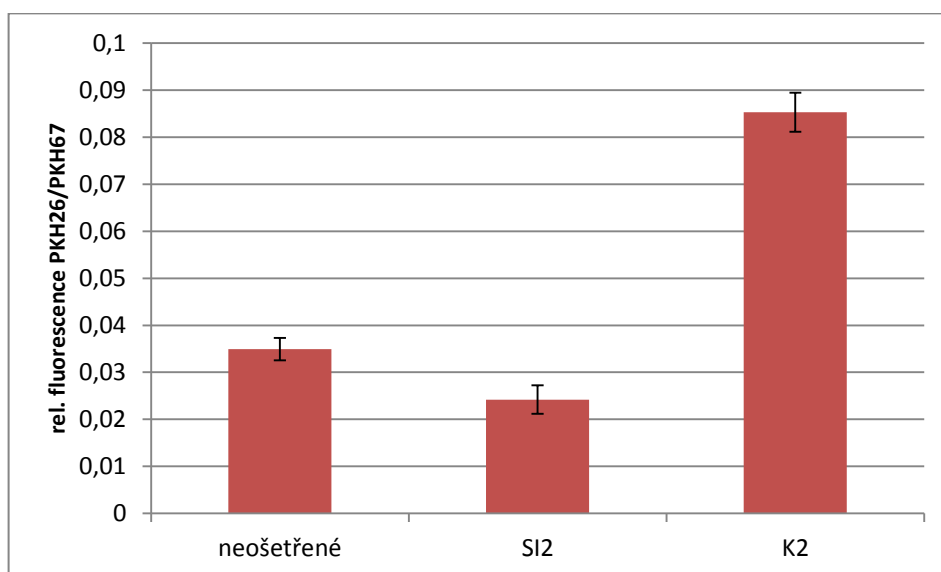
Obrázek 16 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1. Byl použit kontrolní kmen bakterií PAK. Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven na 140) na fluorescenci buněk CuFi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven automaticky) pro reakční směsi: indiferentní protilátka (SI2), kontrolní protilátka (K2), neošetřené (bez přidavku protilátek). Od hodnot rel. fluorescence byla odečtena hodnota fluorescence pozadí (bakterie: 1089; buňky: 4668). Adhezní test byl proveden 1 den po barvení buněk.



Obrázek 17 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1. Byl použit kontrolní kmen bakterií PAK. Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven na 140) na fluorescenci buněk NuLi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven automaticky) pro reakční směsi: indiferentní protilátka (SI2), kontrolní protilátka (K2), neošetřené (bez přidavku protilátek). Od hodnot rel. fluorescence byla odečtena hodnota fluorescence pozadí (bakterie: 1152; buňky: 897). Adhezní test byl proveden 1 den po barvení buněk.



Obrázek 18 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1. Byl použit kontrolní kmen bakterií PAK. Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven na 140) na fluorescenci buněk CuFi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven automaticky) pro reakční směsi: indiferentní protilátka (SI2), kontrolní protilátka (K2), neošetřené (bez přidavku protilátek). Od hodnot rel. fluorescence byla odečtena hodnota fluorescence pozadí (bakterie: 1059; buňky: 997). Adhezní test byl proveden 2 dny po barvení buněk.



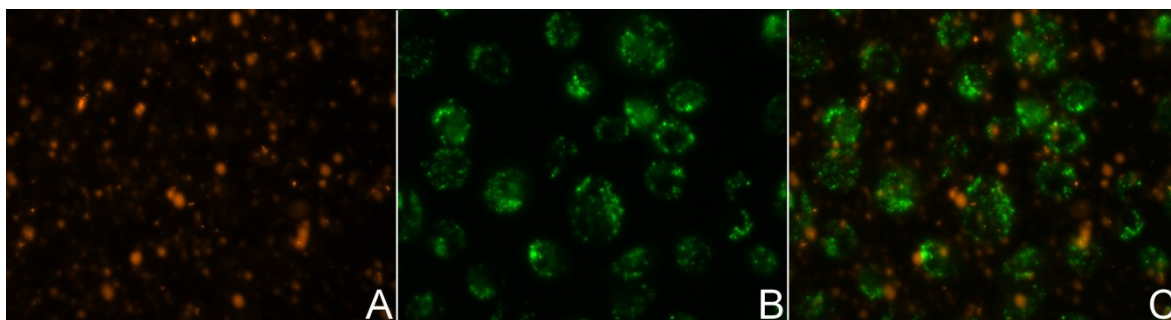
Obrázek 19 - Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1. Byl použit kontrolní kmen bakterií PAK. Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven na 140) na fluorescenci buněk NuLi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, parametr „gain“ nastaven automaticky) pro reakční směsi: indiferentní protilátka (SI2), kontrolní protilátka (K2), neošetřené (bez přidavku protilátek). Od hodnot rel. fluorescence byla odečtena hodnota fluorescence pozadí (bakterie: 1052; buňky: 1905). Adhezní test byl proveden 2 dny po barvení buněk.

4.2.4 Mikroskopické pozorování

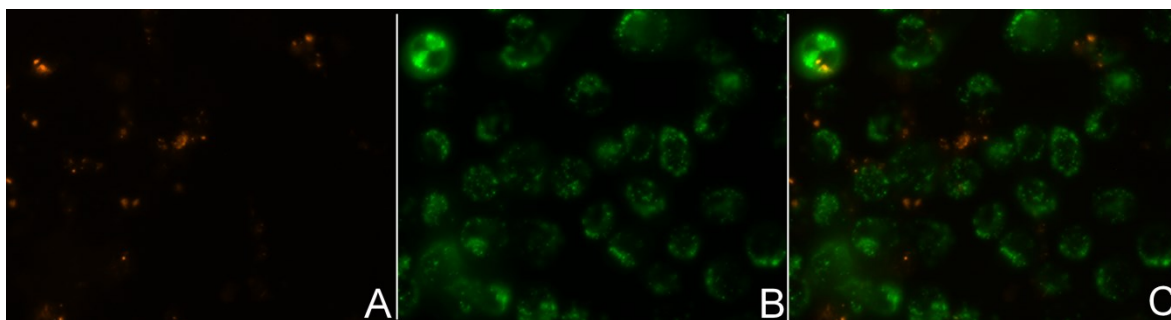
Situace v jednotlivých jamkách u adhezních testů byly dokumentovány mikroskopem Nikon Eclipse s využitím programu NIS-Elements AR 2.30. Pro plicní epitelální buňky

(barvené PKH67) byl použit filtr 31001 FITC C87701, pro bakteriální buňky PAK (barvené PKH26) filtr 31002 RdiI C87702. Snímky byly kolorovány a upraveny v programu ImageJ.

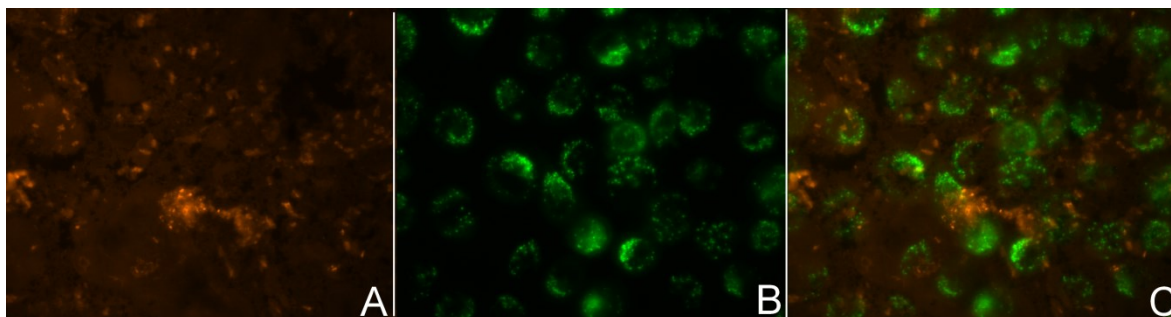
Obrázek 20 zachycuje situaci neošetřených buněk. Obrázek 21 zobrazuje situaci se specifickou protilátkou a je zde pozorovatelný efekt snížení množství navázaných PAK. Na obrázku 22 je znázorněna situace po aplikaci kontrolní protilátky.



Obrázek 20 – Mikroskopické snímky CuFi-1 (PKH67) a PAK (PKH26), bez ošetření protilátkou. Snímky byly pořízeny mikroskopem Nikon Eclipse s využitím programu NIS-Elements AR 2.30 (zvětšení 40x). Snímek A: fluorescence PAK (PKH26), filtr 31002 RdiI C87702; snímek B: CuFi-1, filtr 31001 FITC C87701; snímek C: překryv snímků A a B. Kolorováno v program ImageJ.



Obrázek 21 - Mikroskopické snímky CuFi-1 (PKH67) a PAK (PKH26), ošetření specifickou protilátkou S6. Snímky byly pořízeny mikroskopem Nikon Eclipse s využitím programu NIS-Elements AR 2.30 (zvětšení 40x). Snímek A: fluorescence PAK (PKH26), filtr 31002 RdiI C87702; snímek B: CuFi-1, filtr 31001 FITC C87701; snímek C: překryv snímků A a B. Kolorováno v program ImageJ.



Obrázek 22 - Mikroskopické snímky CuFi-1 (PKH67) a PAK (PKH26), ošetření kontrolní protilátkou K4. Snímky byly pořízeny mikroskopem Nikon Eclipse s využitím programu NIS-Elements AR 2.30 (zvětšení 40x). Snímek A: fluorescence PAK (PKH26), filtr 31002 RdiI C87702; snímek B: CuFi-1, filtr 31001 FITC C87701; snímek C: překryv snímků A a B. Kolorováno v program ImageJ.

5 Diskuze

Cystická fibrosa je autozomálně recesivní onemocnění, které je způsobeno mutací genu *CFTR*. Tento gen kóduje stejnojmenný protein s funkcí chloridového kanálu, jehož poškození vede k narušení rovnováhy iontů, zahuštění hlenu a pozměněné glykosylaci povrchových struktur buněk plicního epitelu. Tyto změny způsobují větší náchylnost k bakteriálním infekcím a následné kolonizaci. Nejčastějším patogenem dýchacích cest pacientů s CF je bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Tato práce je zaměřena na možnost využití slepičích protilátek připravených proti PA-IIL pro pasivní imunizaci. Cílem bylo ověřit vliv těchto specifických protilátek na adhezi PA na buňky plicního epitelu.

Slepičí imunoglobuliny jsou testovány jako prostředek profylaxe proti mnoha různým toxinům a patogenům. Výhodou je jejich snadná izolace a také ekonomická a neinvazivní produkce. V současnosti se slepičí IgY využívají například jako prevence proti rotavirovým infekcím u zvířat. Orálně podané protilátky jsou efektivní při léčbě těchto infekcí také u novorozenců⁵².

Byl zjištěn pozitivní vliv IgY na modulaci obranné imunitní reakce proti PA zprostředkované polymorfonukleárními neutrofily. Zdá se, že perorální profylaxe anti-PA IgY může zvýšit přirozenou imunitu proti PA⁵³. Specifické IgY usnadňují okamžité odstranění bakterií a zmírňují záněty spojené s plicní infekcí PA. Využití těchto protilátek se jeví jako alternativa nebo doplněk antibiotické léčby⁵⁴.

Jako modelový systém byly v této práci použity buněčné linie plicních epitelálních buněk od pacienta s CF (CuFi-1) a od zdravého jedince (NuLi-1). Byla sledována míra adherence kontrolního kmenu *Pseudomonas aeruginosa* (PAK, ST 1763) na tyto epitelální buňky. Pro vizualizaci a kvantifikaci byly buňky a bakterie označeny fluorescenčními barvivy PKH (PKH26 pro bakterie, PKH67 pro buňky).

Experimenty byly prováděny ve 24-jamkových destičkách CellBind, které mají optimální povrch pro navázání buněk. Epiteliální buňky adherují k povrchu jamek a tvoří monovrstvu, která lépe simuluje reálnou situaci v plicích a zároveň chrání buňky před odmytím v jednotlivých krocích adhezního testu.

Fluorescence byla měřena na spektrofotometru a poměry rel. fluorescence byly vyneseny do grafů. Měření bylo vždy doplněno mikroskopickým pozorováním pro ověření úspěšnosti barvení a zhodnocení situací v jednotlivých jamkách – v přítomnosti či bez přítomnosti protilátek.

Byly testovány frakce specifických protilátek proti PA-III uchovávané několik let v chladu v pufru s azidem sodným. Metodou ELISA byla ověřena schopnost těchto protilátek specificky rozpoznat antigen PA-III. Pro porovnání byly použity dva různě modifikované rekombinantní antigeny PA-III: PA-III Δ G/fuc s mutací snižující afinitu pro fukosu a PA-III modifikovaný diazomethanem (PA-III DAM). Bylo ověřeno, že vhodně uchované protilátky neztrácejí svou reaktivitu pro daný antigen ani po několika letech. Obecně byla na ELISA zaznamenána vyšší reaktivita s antigenem PA-III Δ G/fuc.

Metodou adhezního testu byl ověřen vliv specifických protilátek proti PA-III od různých slepic na adhezi bakterií k buňkám plicního epitelu. V předchozích studiích bylo ukázáno, že tyto protilátky vykazují schopnost snižovat bakteriální adhezi⁴⁷. V této práci však takto jednoznačný trend pozorován nebyl. Byla proto věnována pozornost hlubšímu prozkoumání chování protilátek v závislosti na jejich přípravě. Je zřejmé, že většina frakcí specifických protilátek vykazuje schopnost bakteriální adhezi snižovat. Tato schopnost však nekoreluje s reaktivitou ověřenou na ELISA. Z výsledků vyplývá, že frakce mají rozdílný obsah anti-PA-III protilátek. V adhezním testu se protilátky používají vždy ve stejné koncentraci (1 mg/ml), reaktivita proti PA-III prokázaná na ELISA by tudíž měla odpovídat schopnosti snižování adherence PA na epiteliální buňky. Skutečnost je však taková, že protilátky, které vykazovaly výrazně vyšší reaktivitu (přibližně o 1/3) s antigenem PA-III na ELISA, vykazují v adhezním testu srovnatelný, nebo dokonce horší efekt v zabránění vazby PA na buňky epitelu.

Další nejednoznačné výsledky byly pozorovány při srovnání efektu specifické anti-PA-III protilátky na buněčné linie CuFi-1 a NuLi-1. Vycházíme z předpokladu, že na povrchu buněk s CF (CuFi-1) dochází ke změně sialyzace, což vede k obnažení sacharidových struktur, na které se PA váže lektinem PA-III. Efekt anti-PA-III protilátky by tedy měl být podstatně výraznější na rozdíl od linie NuLi-1, u které by tento efekt neměl hrát tak významnou roli. Toto z našich výsledků však nelze jednoznačně vyvodit.

Významným trendem opakovaně potvrzeným i v minulých studiích je zásadní rozdíl v chování specifické a kontrolní protilátky. Bylo vysledováno, že kontrolní protilátky značně zvyšují adhezi PA. Tento jev je pravděpodobně způsoben interakcí sacharidových struktur na povrchu protilátek s bakteriálními buňkami, což vede k aglutinaci a vzniku plaků, které nelze efektivně odmyt. Tento efekt byl dobře mikroskopicky pozorovatelný (obrázek 22 na straně 37). Kontrolní protilátky tak v naprosté většině případů vykazují přesně opačný vliv než anti-PA-III protilátky, které mají tendenci adhezi snižovat. Zde je

důležité si uvědomit, že složení kontrolní a specifické protilátky se liší přítomností jak anti-PA-IIL protilátek, tak protilátek proti adjuvans.

Všechny tyto nejednoznačné výsledky a sledované efekty naznačují, že bakteriální adhezi pravděpodobně neovlivňují jen specifické protilátky proti PA-IIL, ale také protilátky proti adjuvans. Z tohoto důvodu byly pro adhezní testy využity také indiferentní protilátky získané imunizací se stejným adjuvans. Adjuvans jsou látky přidávané k antigenu, které stimulují imunitní odpověď imunizovaného zvířete. V našem případě bylo k antigenu přidáno Freundovo adjuvans, které ve své kompletní formě obsahuje emulzi minerálních olejů a usmrcené mykobakterie. Imunizované zvíře velmi pravděpodobně produkuje do vaječného žloutku kromě specifických protilátek proti danému antigenu také protilátky proti mykobakteriím. Mykobakterie mohou mít některé struktury a virulentní faktory obdobné s PA. Bylo např. prokázáno, že tzv. „common antigen“ obsažený v buněčné stěně PA pozitivně reaguje na protilátky proti 65-kDa mykobakteriálnímu proteinovému antigenu, který je vysoce imunogenní. Oba tyto antigeny obsahují shodné epitopy⁵⁵. Podobnost těchto struktur u obou druhů bakterií se pravděpodobně může projevit ovlivněním adherence PA. Výsledky potvrzují, že tyto protilátky významně ovlivňují chování specifické protilátky a podporují její schopnost snižovat vazbu PA k epiteliálním buňkám. Výrazný trend zde lze pozorovat u linie NuLi-1, u níž se PA-IIL na vazbě patogenu nepodílí tak silně. Kontrolní indiferentní protilátky opět zvyšují adhezi PA. Rozdíl chování kontrolní a specifické indiferentní protilátky podporuje skutečnost, že právě jejich rozdílné složení, tedy přítomnost protilátky proti adjuvans, je logickým vysvětlením výše uvedených trendů.

Byl též sledován vliv časové prodlevy (1-2 dny) po barvení epiteliálních buněk na bakteriální adhezi a protektivní efekt protilátek. Buňky musí být před barvením převedeny do suspenze, jsou vystaveny působení trypsinu a samotný proces barvení může povrchové buněčné struktury také ovlivnit. Lze předpokládat, že díky delší časové prodlevě po barvení dojde k reparaci těchto struktur, které ovlivňují i bakteriální adhezi. Výsledky tento trend naznačují. První den po barvení došlo k vyšší adhezi bakterií než den druhý, a to především v jamkách ošetřených protilátkou. Anti-PA-IIL protilátka má ve všech případech větší protektivní vliv vůči adhezi PA právě druhý den po barvení. Tuto skutečnost je možné vysvětlit tím, že díky efektivnější obnově povrchových buněčných struktur má bakterie méně přístupných vazných míst a specifická protilátka má tedy větší potenciál bránit bakteriím v adherenci. Stejný trend byl ověřen i u indiferentních protilátek.

Další výhodou delšího časového odstupu je nárůst větší hodnoty fluorescence epiteliálních buněk. Lze uvažovat, že dělení buněk sice způsobuje naředění koncentrace fluoreskující sloučeniny v membránách, pravděpodobně tím ale dochází k redukci samozhášení a stínění fluorescence. Tento prodloužený protokol je tedy vhodnou optimalizací pro další experimenty.

V této práci bylo zmíněno, že na adhezi PA k buňkám plicního epitelu mají vliv jak specifické protilátky proti PA-IIL, tak i protilátky proti adjuvans, které jsou společně přítomny ve vaječném žloutku. Pro objasnění, jaký je podíl jednotlivých složek na sledovaném efektu, bude nutné provést afinitní purifikaci protilátek a vyzkoušet vliv pouze specifických protilátek proti PA-IIL. Tato práce je předmětem dalšího výzkumu.

6 Souhrn

- Metodou ELISA byla ověřena schopnost slepičích protilátek proti PA-III specificky vázat daný antigen. Při skladování ve vhodných podmínkách zůstává reaktivita protilátky zachována.
- Delší časová prodleva po barvení plicních epitelálních buněk zvýrazňuje protektivní efekt specifických protilátek vůči adhezi bakterií na tyto buňky. Po druhém dni byla naměřena vyšší hodnota fluorescence.
- Specifické protilátky proti PA-III mají v převážné většině případů schopnost snižovat adhezi PA k buňkám plicního epitelu. Tato schopnost však nekoreluje s reaktivitou proti PA-III na ELISA.
- Kontrolní protilátky naopak způsobují zvýšenou bakteriální adhezi pravděpodobně díky aglutinaci PA, která vede ke tvorbě plaků.
- Rozdíl v chování kontrolní a specifické protilátky je připisován kombinovanému vlivu protilátek proti PAIII a adjuvans. Protilátky proti adjuvans významně snižují adherenci PA na plicní epitelální buňky.

7 Seznam použité literatury

1. Vávrová, V. *Cystická fibróza*. (Grada Publishing a.s., 2006).
2. Vávrová, V. & Bartošová, J. *Cystická fibróza: příručka pro nemocné a jejich rodiče*. (Professional Publishing, 2009).
3. Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D. & Cox, T. K.
Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073 (1989).
4. Rowntree, R. K. & Harris, A. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Ann. Hum. Genet.* **67**, 471–485 (2003).
5. Akabas, M. H. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function of an epithelial chloride channel. *J. Biol. Chem.* **275**, 3729–3732 (2000).
6. Welsh, M., Ramsey, B., Accurso, F., Cutting, G., Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. & Valle, D. The metabolic and molecular basis of inherited disease. *Metab. Mol. Bases Inherit. Dis.* (2001).
7. Cystic Fibrosis: The History of a Real Autosomal Recessive Disorder. *Sutori* (2016).
8. Sabharwal, S. Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 43–47 (2016).
9. Ong, T., Marshall, S. G., Karczeski, B. A., Stern, D. L., Cheng, E. & Cutting, G. R.
in *GeneReviews*(®) (eds. Pagon, R. A., Adam, M. P., Ardinger, H. H., Wallace, S. E., Amemiya, A., Bean, L. J., Bird, T. D., Ledbetter, N., Mefford, H. C., Smith, R. J. & Stephens, K.) (University of Washington, Seattle, 1993).
10. Boucher, R. C. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur. Respir. J.* **23**, 146–158 (2004).
11. Kasper, D. L., Braunwald, E., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J. L. & Fauci, A. S.
Harrison's Principles of Internal Medicine. (McGraw Hill Professional, 2006).

12. Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K. C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J. R., Randell, S., Boucher, R. C. & Döring, G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* **109**, 317–325 (2002).
13. Poschet, J. F., Boucher, J. C., Tatterson, L., Skidmore, J., Dyke, R. W. V. & Deretic, V. Molecular basis for defective glycosylation and *Pseudomonas* pathogenesis in cystic fibrosis lung. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 13972–13977 (2001).
14. Barasch, J. & Al-Awqati, Q. Defective acidification of the biosynthetic pathway in cystic fibrosis. *J Cell Sci* **1993**, 229–235 (1993).
15. Holder, I. A. *Pseudomonas* immunotherapy: a historical overview. *Vaccine* **22**, 831–839 (2004).
16. Hassan, R., El-Naggar, W., Abd El-Aziz, A. M., Shaaban, M., Kenawy, H. I. & Ali, Y. M. Immunization with outer membrane proteins (OprF and OprI) and flagellin B protects mice from pulmonary infection with mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*
17. Rosenstein, B. J. & Cutting, G. R. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J. Pediatr.* **132**, 589–595 (1998).
18. Bush, A. *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. (Karger Medical and Scientific Publishers, 2006).
19. Gibson, L. E. & Cooke, R. E. A Test for Concentration of Electrolytes in Sweat in Cystic Fibrosis of the Pancreas Utilizing Pilocarpine by Iontophoresis. *Pediatrics* **23**, 545–549 (1959).
20. LeGrys, V. A. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: Practical considerations. *J. Pediatr.* **129**, 892–897 (1996).

21. Hořejší, V. & Bartůňková, J. *Základy imunologie*. **3**, (Triton, 1998).
22. Bals, R., Weiner, D. J. & Wilson, J. M. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest.* **103**, 303–307 (1999).
23. Grasemann, H., Michler, E., Wallot, M. & Ratjen, F. Decreased concentration of exhaled nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **24**, 173–177 (1997).
24. Sompayrac, L. M. *How the immune system works*. (John Wiley & Sons, 2015).
25. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. **1**, (Current Biology Singapore, 1997).
26. Klemperer, F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **31**, 356–382 (1893).
27. Rose, M. E., Orlans, E. & Butters, N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.* **4**, 521–523 (1974).
28. Gassmann, M., Thömmes, P., Weiser, T. & Hübscher, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* **4**, 2528–2532 (1990).
29. Carlander, D., Stålberg, J. & Larsson, A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Ups. J. Med. Sci.* **104**, 179–189 (1999).
30. Carlander, D., Kollberg, H., Wejåker, P.-E. & Larsson, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol. Res.* **21**, 1–6 (2000).
31. Sinha, J. & Bhattacharya, S. *A Text book of Immunology*. (Academic Publishers, 2006).

32. Schade, R., Pfister, C., Halatsch, R. & Henklein, P. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk--an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. *Altern. Lab. Anim. ATLA* (1991).
33. Engineering Microbes To Kill Pseudomonas.
<http://www.science20.com/curious_cub/engineering_microbes_kill_pseudomonas-81930> (duben 2017)
34. Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. *Medical microbiology*. (Elsevier Health Sciences, 2015).
35. Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A. & Vávra, J. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. (Marvil, 1996).
36. Ryan, K. J., Ray, C. G. & Sherris, J. C. *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases*. (McGraw-Hill, 2004).
37. Pseudomonas. <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas_2.html> (březen 2017)
38. Clatworthy, A. E., Pierson, E. & Hung, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 541–548 (2007).
39. Gilboa-Garber, N. Pseudomonas aeruginosa lectins. *Methods Enzymol.* **83**, 378–385 (1982).
40. DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. De-Lano Scientific, San Carlos, CA, USA. *Httpwww Pymol Org* (2002).
41. Cioci, G., Mitchell, E. P., Gautier, C., Wimmerová, M., Sudakevitz, D., Pérez, S., Gilboa-Garber, N. & Imberty, A. Structural basis of calcium and galactose recognition by the lectin PA-IL of Pseudomonas aeruginosa. *FEBS Lett.* **555**, 297–301 (2003).

42. Mitchell, E., Houles, C., Sudakevitz, D., Wimmerova, M., Gautier, C., Pérez, S., Wu, A. M., Gilboa-Garber, N. & Imberty, A. Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **9**, 918–921 (2002).
43. Rhim, A. D., Kothari, V. A., Park, P. J., Mulberg, A. E., Glick, M. C. & Scanlin, T. F. Terminal glycosylation of cystic fibrosis airway epithelial cells. *Glycoconj. J.* **17**, 385–391 (2000).
44. Mewe, M., Tielker, D., Schönberg, R., Schachner, M., Jaeger, K.-E. & Schumacher, U. *Pseudomonas aeruginosa* lectins I and II and their interaction with human airway cilia. *J. Laryngol. Amp Otol.* **119**, 595–599 (2005).
45. Gustke, H., Kleene, R., Loers, G., Nehmann, N., Jaehne, M., Bartels, K.-M., Jaeger, K.-E., Schachner, M. & Schumacher, U. Inhibition of the bacterial lectins of *Pseudomonas aeruginosa* with monosaccharides and peptides. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 207–215 (2012).
46. Reymond, J.-L., Bergmann, M. & Darbre, T. Glycopeptide dendrimers as *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 4814–4822 (2013).
47. Vašková, L., Nosková, L., Bláhová, B., Wimmerová, M., Dřevínek, P., Kubíčková, B., Stiborová, M. & Hodek, P. Evaluation of anti-PAIIL lectin hen yolk antibody as an agent inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells. *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* **147**, 889–896 (2016).
48. CuFi-1 ATCC ® CRL-4013TM Homo sapiens Lung epithelium.
<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4013.aspx?geo_country=cz#generalinformation> (duben 2017)

49. NuLi-1 ATCC ® CRL-4011™ Homo sapiens Lung epithelium.
<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4011.aspx?geo_country=cz#generalinformation> (duben 2017)
50. Nosková, L. *Studium adheze Pseudomonas aeruginosa na buňky plicního epitelu, Diplomová práce.* (PřF UK, 2013).
51. Vašková, L. *Studium vlivu IgY na interakce bakterií a plicních buněk v podmínkách ex vivo.* (PřF UK, 2016).
52. Thu, H. M., Myat, T. W., Win, M. M., Thant, K. Z., Rahman, S., Umeda, K., Nguyen, S. V., Icatlo, F. C., Higo-Moriguchi, K., Taniguchi, K., Tsuji, T., Oguma, K., Kim, S. J., Bae, H. S. & Choi, H. J. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) for Prophylaxis and Treatment of Rotavirus Diarrhea in Human and Animal Neonates: A Concise Review. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **37**, 1–9 (2017).
53. Thomsen, K., Christophersen, L., Jensen, P. Ø., Bjarnsholt, T., Moser, C. & Høiby, N. Anti-Pseudomonas aeruginosa IgY antibodies promote bacterial opsonization and augment the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophils. *Hum. Vaccines Immunother.* **12**, 1690–1699 (2016).
54. Thomsen, K., Christophersen, L., Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Moser, C. & Høiby, N. Anti-Pseudomonas aeruginosa IgY antibodies augment bacterial clearance in a murine pneumonia model. *J. Cyst. Fibros.* **15**, 171–178 (2016).
55. Shinnick, T. M., Vodkin, M. H. & Williams, J. C. The Mycobacterium tuberculosis 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the Escherichia coli GroEL protein. *Infect. Immun.* **56**, 446–451 (1988).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka